

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología II

**Estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos
betalactámicos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp.**

Tesis doctoral

Susana López Hernández

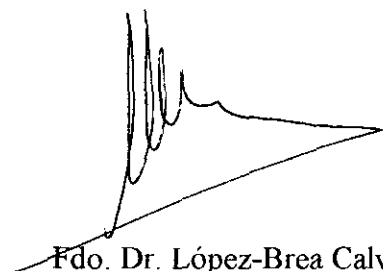
Madrid, 1998

Manuel López-Brea Calvo, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa, y Profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Teresa Alarcón Caverro, Doctora en Ciencias Biológicas.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter spp.*”** realizada por Susana López Hernández para optar al título de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 21 de Octubre de 1998.

A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes followed by a horizontal line and a small loop at the end.

Fdo. Dr. López-Brea Calvo

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'A' followed by the word 'Alarcón' and a horizontal line underneath.

Fdo. Dra. Alarcón Caverro

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de este trabajo hay muchas personas que, de una manera o de otra, me han prestado su ayuda desinteresada, haciendo posible la culminación de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. López-Brea la confianza depositada en mí, así como todo el tiempo dedicado hasta la finalización del trabajo.

Mi reconocimiento también va dirigido a la Dra. Teresa Alarcón por su aportación de ideas y la dedicación de su tiempo, así como por su apoyo en todo momento.

Asimismo, quiero agradecer a la Dra. Laura Cardeñoso su interés en mi trabajo, y las dosis de ánimo en los momentos difíciles. Mi agradecimiento también al resto de adjuntos y residentes, así como al personal técnico y administrativo del laboratorio de Microbiología del Hospital de la Princesa; en especial a mis compañeras de residencia Pilar y Aurora, por crear un ambiente agradable de trabajo.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Quiero expresar mi gratitud a los Dres. Luis Martínez-Martínez y Álvaro Pascual por la oportunidad que me brindaron para permanecer en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, donde realicé una parte importante del trabajo. Mi agradecimiento también va dirigido a todo el personal del laboratorio, especialmente a Sofia y a Carmen, por su desinteresada ayuda a la hora de desarrollar las técnicas, así como por su gran hospitalidad.

Por último quiero agradecer a mis padres y a mis hermanos el estar siempre a mi lado, y en especial a Javier por su paciencia y por su constante ayuda y apoyo a lo largo de todos estos años.

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

βL: betalactamasa.

A: absorbancia.

A₄₉₂: absorbancia a 492 nm.

AAC: acetilación.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNasa: ácido desoxirribonucleasa.

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*.

AK: amicacina.

AMB: ambulatorio.

AMC: amoxicilina-clavulánico.

AMP: ampicilina.

ANT: adenilación.

APH: fosforilación.

ARDRA: (*amplified rDNA restriction analysis*) análisis de restricción de fragmentos de

ADNr amplificados.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ARNsa: Ribonucleasa.

AS: Ampicilina/sulbactam.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

AUS: agarosa, urea, sorbitol.

AZIT: azitromicina.

AZT: aztreonam.

BAS: broncoaspirado.

BHI: (*brain heart infusion*) infusión cerebro corazón.

BLEA: betalactamasa de espectro ampliado.

BTL: betalactámico.

CARB: carbenicilina.

CAZ: ceftazidima.

CBP: carbapenémicos.

CEF: cefalosporinas.

CEF: cefepima.

CFZ: cefazolina.

CLA: ácido clavulánico.

CLOXA: cloxacilina.

CMB: concentración mínima bactericida.

CMI: concentración mínima inhibitoria.

CMI₅₀: La CMI para el 50% de las cepas probadas.

CMI₉₀: La CMI para el 90% de las cepas probadas.

col.: colaboradores.

Cpsas: carbapenemasas.

Csas: cefalosporinasas.

CT: colistina.

CTAB: bromuro de cetil-trimetil amonio.

CTX: cefotaxima.

CXM: cefuroxima.

Cxsas: cefuroximasas.

DOX: doxiciclina.

E: esputo.

EDTA: ácido etilen-diamino-tetra-acético.

ERIC-PCR: PCR con iniciadores ERIC (*enterobacterias, repetitivas, intergénicas, consensus*).

FO: fosfomicina.

GN: gentamicina.

gyrA: gen de la girasa A (topoisomerasa II).

gyrB: gen de la girasa B.

h: horas.

IMP: imipenem.

LCR: líquido cefalorraquídeo.

LOR: cefaloridina.

LPS: lipopolisacárido.

MEP: meropenem.

min.: minutos.

MIR: Medicina Interna.

MONOB: monobactámicos.

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.

NCF: nitrocefina.

NRL: neurología.

O: orina.

OF: ofloxacino.

OMP: (*outer membrane protein*) proteína de membrana externa.

OXA: oxacilina.

p-CMB: para-cloro-mercurobenzoato.

PADAC: *pyridium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore*.

parC: gen de la topoisomerasa IV.

pb: pares de bases.

PBP: (*penicillin binding protein*) proteínas fijadoras de penicilina.

PCR: (*polymerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa.

PEN: bencilpenicilina.

PENI: penicilinas.

pI: punto isoelectrico.

PIP: piperacilina.

pm: peso molecular.

Psas: penicilinasas.

PUCA: punta de catéter.

RD: rifampicina.

rep-PCR: PCR con secuencias rep (*repetitivas, extragenicas, palindromicas*).

RESP: muestras respiratorias.

SAN: muestra de sangre (hemocultivo).

SDS-PAGE: electroforesis con geles de poliacrilamida-SDS.

SDS: dodecil sulfato sódico.

seg.: segundos.

SULB: sulbactam.

TAZ: tazobactam.

TBE: tampón tris/ácido bórico/EDTA.

TE. tampón tris/EDTA.

TIC: ticarcilina.

TICCL: ticarcilina/clavulánico.

TO: tobramicina.

TZP: piperacilina-tazobactam.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

UFC: unidad formadora de colonias.

LISTADO DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
1.1. Especies genómicas de acuerdo con la homología del ADN, según los estudios de Bouvet y de Tjernberg y Ursing.....	4
1.2. Diferenciación fenotípica de las especies de <i>Acinetobacter</i>	21
1.3. Biotipos definidos por Bouvet y Grimont (1987) y Bouvet (1990).....	29
1.4. Esquema clasificatorio de las betalactamasas (Bush, Jacoby y Medeiros (1995))....	48
1.5. Enzimas inactivantes de aminoglucósidos en <i>Acinetobacter</i> spp.....	75
 3.1. Origen de los microorganismos aislados.....	 86
3.2 Porcentaje de reacciones positivas en el sistema API 20NE en <i>Acinetobacter</i>	91
3.3. Biotipos definidos por Bouvet y Grimont (1987), Bouvet (1990) y Gerner-Smidt (1993).....	93
3.4. Solventes y diluyentes de los antibióticos betalactámicos estudiados.....	96
3.5. Solventes y diluyentes de los antibióticos no betalactámicos estudiados.....	99
3.6. Criterios de sensibilidad para los antibióticos betalactámicos probados (CMI en mg/l).....	100
3.7 Criterios de sensibilidad para los antibióticos no betalactámicos probados (CMI en mg/l).....	102
3.8. Fenotipos de resistencia a betalactámicos.....	102
3.9. Puntos de corte según los diferentes criterios A y B.....	102
4.1. Porcentaje de pruebas API positivas.....	119
4.2. Pruebas bioquímicas que mostraron resultado negativo para el total de los microorganismos estudiados.....	119
4.3. Biotipos mayoritarios definidos por el sistema API 20 NE.....	121
4.4. Biotipos minoritarios definidos por el sistema API 20 NE.....	122
4.5. Distribución de los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> según el perfil de biotipado de Bouvet y Grimont (B y G).....	123
4.6. Distribución de los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> según el perfil de OMPs.....	125

	<u>Pág.</u>
4.7. Distribución de los aislamientos estudiados por rep-PCR.....	128
4.8. Distribución de los aislamientos según biotipo API 20 NE y tipado con rep-PCR.....	131
4.9. Distribución de los aislamientos según el biotipado de Bouvet y Grimont (B y G) y rep-PCR.....	131
4.10. Distribución de los aislamientos según el perfil de OMPs y rep-PCR.....	131
4.11. Distribución de los aislamientos según biotipo API y tipado de Bouvet y Grimont (B y G).....	132
4.12. Distribución de los aislamientos según biotipo API y perfil de OMPs.....	132
4.13. Distribución de los aislamientos según biotipado de Bouvet y Grimont (B y G) y perfil de OMPs.....	132
4.14. Distribución de los genotipos según la procedencia de los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> estudiados.....	134
4.15. Distribución de los genotipos según el origen de la muestra.....	135
4.16. Sensibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>Acinetobacter</i> spp. a los antibióticos betalactámicos.....	137
4.17. Sensibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>Acinetobacter</i> spp a los antibióticos no betalactámicos.....	138
4.18. CMI ₅₀ /CMI ₉₀ (µg/ml) de los antibióticos betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.....	141
4.19. CMI ₅₀ /CMI ₉₀ (µg/ml) de los antibióticos betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.....	141
4.20. CMI ₅₀ /CMI ₉₀ (µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.....	142
4.21. Perfiles de resistencia a betalactámicos en los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> según el criterio A.....	148
4.22. Perfiles de resistencia a betalactámicos en los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> según el criterio B.....	149
4.23. Distribución de los extractos enzimáticos según la actividad betalactamasa mediante la prueba de la nitrocefina.....	150

	<u>Pág.</u>
4.24. Comparación de la prueba de la reacción de la NCF con el pI de los extractos enzimáticos.....	152
4.25. Relación entre el pI y tiempo de positividad para la prueba de la nitrocefina.....	152
4.26. Distribución del pI en el total de extractos enzimáticos estudiados.....	152
4.27. Distribución de las betalactamasas en los aislamientos clínicos de <i>Acinetobacter</i> spp.....	155
4.28. Perfil inhibitorio de los enzimas de referencia TEM-1, expresado como la media de porcentajes de máxima inhibición.....	157
4.29. Perfiles de inhibición de betalactamasas cromosómicas.....	159
4.30. Perfiles de inhibición de betalactamasas cromosómicas.....	159
4.31. Comparación de las propiedades bioquímicas de las cefalosporinas de cepas agrupadas en genotipos.....	160
4.32. Comparación de las propiedades bioquímicas de las betalactamasas de cepas no agrupables.....	161
4.33. Distribución de las cepas genéticamente relacionadas según la actividad hidrolítica de bencilpenicilina y el pI.....	166
4.34. Distribución de las cepas no relacionadas genéticamente según la actividad hidrolítica de bencilpenicilina y el pI.....	166
4.35. Perfil de hidrólisis de las cefalosporinas de <i>Acinetobacter</i> spp.....	167
4.36. Relación de cepas elegidas con sus correspondientes valores de CMI a cefalosporinas de 3ª generación.....	168
4.37. Comparación de los valores de CMI a cefalosporinas de 3ª generación, en diferentes cepas que presentan hiperproducción de betalactamasas.....	171
4.38. CMI a cefalosporinas de 3ª generación, en diferentes cepas que no presentan hiperproducción de betalactamasas.....	171
4.39. Máximo porcentaje de inhibición del extracto 103 (TEM-1 + Csa).....	172
4.40. Máximo porcentaje de inhibición de las nuevas betalactamasas.....	173
4.41. Máximo porcentaje de inhibición de las nuevas betalactamasas.....	173
4.42. Perfil de hidrólisis de las betalactamasas de <i>Acinetobacter</i> spp.....	177
4.43. Perfil de hidrólisis de las betalactamasas de <i>Acinetobacter</i> spp.....	177.

	<u>Pág.</u>
4.44. Relación de la CMI de la cepa portadora de carbapenemasa y cepa curada respectivamente.....	178
4.45. Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en <i>Acinetobacter</i> (criterio A).....	186
4.46. Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en <i>Acinetobacter</i> (criterio B).....	186
4.47. Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en <i>Acinetobacter</i> (criterio A).....	187
4.48. Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en <i>Acinetobacter</i> (criterio B).....	187

LISTADO DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
1.I. Aspecto de las colonias de <i>Acinetobacter</i> spp. en agar sangre.....	25
1.II. Identificación de <i>Acinetobacter anitratus/haemolyticus</i> mediante el sistema Microscan.....	25
3.I. Distribución de los aislamientos según los distintos Servicios.....	85
4.I. Identificación de <i>Acinetobacter baumannii</i> mediante el sistema API 20 NE.....	118
4.II. Comparación de diferentes perfiles de OMPs obtenidos en aislamientos clínicos de <i>Acinetobacter</i>	126
4.III (A, B). Comparación de diferentes perfiles de rep-PCR obtenidos en aislamientos clínicos de <i>Acinetobacter</i>	129
4.III (C, D). Comparación de diferentes perfiles de rep-PCR obtenidos en aislamientos clínicos de <i>Acinetobacter</i>	130
4.IV. Distribución de cepas por años de aislamientos.....	140
4.V. Variación del porcentaje de sensibilidad a antibióticos betalactámicos estudiados en los diferentes años de aislamiento de los microorganismos.....	143
4. VI. Variación del porcentaje de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos estudiados en los diferentes años de aislamiento de los microorganismos.....	144
4.VII. Distribución de los porcentajes de sensibilidad a antibióticos betalactámicos según la procedencia de los aislamientos.....	145
4.VIII. Distribución de los porcentajes de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos según la procedencia de los aislamientos.....	146
4.IX. Distribución de los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> spp. en los diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos.....	148
4.X. Distribución de los aislamientos de <i>Acinetobacter</i> spp. en los diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos.....	149
4.XI. Isoelectroenfoque de las betalactamasas de <i>Acinetobacter</i> en geles de poliacrilamida.....	153

	<u>Pág.</u>
4.XII. Perfil inhibitorio cualitativo de las betalactamasas de <i>Acinetobacter</i>	156
4.XIII. Variación de la inhibición con el tiempo en algunas cefalosporinasas de <i>Acinetobacter</i>	162
4.XIV. Variación de la inhibición con el tiempo en algunas cefalosporinasas de <i>Acinetobacter</i>	163
4.XV. Prueba de la inducción de betalactamasas por el método de incorporación de inductor al agar.....	170
4.XVI. Actividad carbapenemasa por el método microbiológico.....	175
4.XVII. Perfil plasmídico de cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> productoras de carbapenemasa.....	179
4.XVIII. Comparación de los perfiles de OMPs obtenidos en <i>Acinetobacter</i> a diferentes concentraciones de proteína.....	182
4.XIX. Comparación de los perfiles de OMPs obtenidos en diferentes aislamientos clínicos de <i>Acinetobacter</i>	183
4.XX. Porcentajes de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en los diferentes genotipos.....	190
4.XXI. Porcentajes de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos en los diferentes genotipos.....	191
4.XXII. Distribución de los genotipos de <i>Acinetobacter</i> según el patrón de resistencia a betalactámicos (criterios A y B respectivamente).....	192
4.XXIII. Distribución de las betalactamasas de <i>Acinetobacter</i> en los diferentes genotipos.....	193

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
LISTADO DE ABREVIATURAS	III
LISTADO DE TABLAS.....	VIII
LISTADO DE FIGURAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HISTORIA DEL MICROORGANISMO: TAXONOMÍA.....	2
1.2. IMPLICACIÓN CLÍNICA DE <i>ACINETOBACTER</i>	5
1.2.1. <i>Especies de importancia clínica.</i>	5
1.2.2. <i>Infecciones causadas por Acinetobacter.</i>	6
1.2.2.1. Infección respiratoria.	7
1.2.2.2. Infecciones del tracto urinario.	8
1.2.2.3. Bacteriemias.	8
1.2.2.4. Meningitis.....	9
1.2.2.5. Otras infecciones.....	10
1.2.3. <i>Patogénesis del microorganismo.</i>	11
1.2.3.1. Factores predisponentes.	11
1.2.3.2. Factores de virulencia.	11
1.2.3.3. Persistencia en el ambiente hospitalario.	13
1.2.4. <i>Terapia de las infecciones por Acinetobacter.</i>	15
1.3. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.	17
1.3.1. <i>Identificación a nivel de género.</i>	17
1.3.2. <i>Identificación a nivel de especie.</i>	19
1.4. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>ACINETOBACTER</i>	26
1.4.1. <i>Métodos de tipado.</i>	26
1.4.1.1. Métodos fenotípicos.....	27
1.4.1.1.1. Biotipado.....	27
1.4.1.1.2. Perfil de proteínas de membrana externa.....	29
1.4.1.1.3. Otros métodos de tipado fenotípico.....	30

1.4.1.2. Métodos genotípicos.....	31
1.5. ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	33
1.6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	37
1.6.1. Multirresistencia.....	37
1.6.2. Perfiles de resistencia a betalactámicos.....	38
1.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.....	40
1.7.1. Betalactamasas.....	40
1.7.1.1. Detección de las Betalactamasas.....	40
1.7.1.2. Caracterización de las betalactamasas.....	42
1.7.1.2.1. Punto isoelectrico.....	42
1.7.1.2.2. Perfil de hidrólisis de betalactámicos.....	44
1.7.1.2.3. Perfil inhibitorio.....	45
1.7.1.3. Clasificación de betalactamasas.....	46
1.7.1.4. Betalactamasas en <i>Acinetobacter</i> spp.....	49
1.7.1.4.1. Cefalosporinasas.....	50
1.7.1.4.2. Penicilinasas.....	50
1.7.1.4.3. Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA).....	52
1.7.1.4.4. Resistencia a Carbapenémicos mediado por betalactamasas.....	53
1.7.1.4.4.1. Carbapenemasas.....	53
1.7.1.4.4.2. Oxacilinasas.....	54
1.7.1.4.4.3. Cefalosporinasas.....	55
1.7.1.5. Localización genética de las betalactamasas.....	55
1.7.1.5.1. Betalactamasas cromosómicas.....	55
1.7.1.5.2. Betalactamasas plasmídicas.....	58
1.7.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana externa.....	60
1.7.2.1. Proteínas de membrana externa.....	60
1.7.2.2. Papel de las porinas en la permeabilidad de la membrana externa. Naturaleza porina de las OMPs.....	63
1.7.2.3. Resistencia a antimicrobianos por alteraciones de la membrana externa.....	64

1.7.2.4. Complementación entre impermeabilidad y mecanismos de inactivación o eliminación	67
1.7.2.5 . Resistencia a carbapenémicos debido a alteraciones de las OMPs	68
1.7.3. Alteración de las proteínas fijadoras de penicilina.	70
1.7.4. Mecanismos de “eflujo” (bombas de expulsión activa).	72
1.8. MECANISMO DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS.	74
1.8.1. Enzimas inactivantes de aminoglucósidos.	74
1.9. RESISTENCIA A FLUORQUINOLONAS.....	77
1.10. RESISTENCIA A OTROS ANTIBIÓTICOS.....	79
 2.OBJETIVOS.	80
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
3.1. MICROORGANISMOS.....	84
3.1.1. Procedencia de los microorganismos.....	84
3.1.2. Cepas control.....	87
3.1.3. Conservación de cepas.	87
3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS. MÉTODOS	
FENOTÍPICOS.	88
3.2.1. Sistema Microscan.	88
3.2.2. Sistema API 20 NE.....	88
3.2.3. Hemólisis y Temperatura de crecimiento.	89
3.3. ESTUDIOS DE TIPADO.	92
3.3.1. Biotipado por Sistema API 20 NE.	92
3.3.2. Biotipado de Bouvet y Grimont.	92
3.3.3. PCR de elementos repetitivos (rep-PCR).....	93
3.3.4. Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs).	94

3.4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> .	95
3.4.1. <i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Método de dilución en agar.</i>	97
3.4.2. <i>Puntos de corte de resistencia.</i>	98
3.4.3. <i>Perfiles de resistencia.</i>	101
3.5. ESTUDIO DE LAS BETALACTAMASAS EN <i>ACINETOBACTER</i> .	103
3.5.1. <i>Ensayo de la actividad betalactamasa.</i>	103
3.5.1.1. <i>Extracción de las Betalactamasas.</i>	103
3.5.1.2. <i>Detección cualitativa de betalactamasas mediante el ensayo de la nitrocefina.</i>	103
3.5.2. <i>Caracterización de las betalactamasas mediante isoelectroenfoque.</i>	104
3.5.3. <i>Caracterización de las betalactamasas mediante el perfil inhibitorio.</i>	104
3.5.3.1. <i>Determinación cualitativa por isoelectroenfoque.</i>	104
3.5.3.2. <i>Ensayo de competición de la Nitrocefina.</i>	105
3.5.3.2.1. <i>Determinación cualitativa.</i>	106
3.5.3.2.2. <i>Determinación cuantitativa.</i>	106
3.5.4. <i>Perfil de hidrólisis.</i>	107
3.5.4.1. <i>Ensayo microbiológico.</i>	107
3.5.4.2. <i>Ensayo espectrofotométrico. Determinación de la actividad enzimática específica.</i>	108
3.5.5. <i>Estudio del caracter inducible/constitutivo de las betalactamasas cromosómicas.</i>	109
3.5.5.1. <i>Prueba de sinergia de doble disco.</i>	109
3.5.5.2. <i>Incorporación de inductor al agar.</i>	109
3.5.6. <i>Estudio de la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas.</i>	110
3.5.7. <i>Localización genética de las posibles nuevas betalactamasas.</i>	111
3.5.7.1. <i>Estudio de plásmidos.</i>	111
3.5.7.2. <i>Curado de plásmidos.</i>	112
3.6. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.	113
3.6.1. <i>Perfil de proteínas de membrana (OMPs).</i>	113

4. RESULTADOS.....	116
4.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE MÉTODOS FENOTÍPICOS.....	117
4.1.1. Sistema API 20 NE.....	117
4.1.2. Hemólisis y Temperatura de crecimiento.....	117
4.2. ESTUDIOS DE TIPADO.....	120
4.2.1. Métodos fenotípicos.....	120
4.2.1.1. Biotipado por el sistema API 20 NE.....	120
4.2.1.2. Biotipado por el sistema de Bouvet y Grimont.....	120
4.2.1.3. Perfil de proteínas de membrana externa.....	124
4.2.2. Métodos genotípicos. REP-PCR.....	127
4.2.3. Comparación entre los métodos de tipado.....	127
4.2.4. Estudio de los diferentes grupos establecidos tras el tipado de los microorganismos.....	133
4.3. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i>	135
4.3.1. Resultados del estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	135
4.3.1.1. Sensibilidad antimicrobiana a betalactámicos.....	135
4.3.1.2. Sensibilidad antimicrobiana a antibióticos no betalactámicos.....	136
4.3.2. Variación de la sensibilidad antibiótica en el período de tiempo estudiado.....	139
4.3.3. Variación de la sensibilidad según la procedencia de los microorganismos.....	139
4.4. PERFILES DE RESISTENCIA.....	147
4.5. ESTUDIO DE BETALACTAMASAS.....	150
4.5.1. Detección cualitativa de la actividad betalactamasa.....	150
4.5.2. Determinación del pI mediante isoelectroenfoque.....	150
4.5.3. Caracterización de las betalactamasas.....	154
4.5.3.1. Determinación del perfil inhibitorio.....	154
4.5.3.1.1. Perfil inhibitorio mediante isoelectroenfoque.....	154
4.5.3.1.2. Perfil inhibitorio mediante un ensayo cromogénico (Determinación cualitativa).....	154

4.5.3.2. Caracterización de betalactamasas cromosómicas.....	157
4.5.3.2.1. Perfil de inhibición de las betalactamasas cromosómicas.....	157
4.5.3.2.1.1. Determinación cuantitativa.....	157
4.5.3.2.1.2. Máximo porcentaje de inhibición.....	158
4.5.3.2.2. Perfil de hidrólisis.....	164
4.5.3.2.2.1. Método microbiológico.....	164
4.5.3.2.2.2. Método espectrofotométrico.....	164
4.5.3.2.3. Caracter inductor/constitutivo de las betalactamasas cromosómicas.....	168
4.5.3.1.4. Hiperproducción de betalactamasa cromosómica.....	169
4.5.3.3. Betalactamasas plasmídicas tipo TEM-1. Perfil de inhibición.....	172
4.5.3.4. Nuevas betalactamasas.....	172
4.5.3.4.1. Determinación cuantitativa del perfil de inhibición.....	173
4.5.3.4.2. Perfil de hidrólisis.....	174
4.5.3.4.2.1. Método microbiológico.....	174
4.5.3.4.2.2. Método espectrofotométrico.....	176
4.5.3.4.3. Caracterización genética de las betalactamasas: estudio de plásmidos de resistencia.....	178
4.6. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.....	180
4.6.1. Optimización de la concentración de proteínas.....	180
4.6.2. Alteración de las OMPs como posible mecanismo de resistencia.....	180
4.7. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO DE RESISTENCIA Y LA PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS EN ACINETOBACTER.....	185
4.8. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA ENTRE LAS CEPAS GENÉTICAMENTE RELACIONADAS Y DE APARICIÓN ESPORÁDICA.....	188
4.8.1. Sensibilidad antimicrobiana en los diferentes genotipos de Acinetobacter.....	188
4.8.2. Distribución de las betalactamasas en los diferentes genotipos.....	188

5. DISCUSIÓN.....	194
5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	195
5.2. TIPADO DE LOS MICROORGANISMOS.....	197
5.3. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	201
5.4. ESTUDIO DE BETALACTAMASAS.....	204
5.4.1. <i>Producción y distribución de las betalactamasas en Acinetobacter</i>	204
5.4.2. <i>Betalactamasas cromosómicas</i>	206
5.4.2.1. Estudios de inducción de betalactamasas en <i>Acinetobacter</i>	211
5.4.2.2. Hiperproducción de betalactamasas cromosómicas.....	213
5.4.3. <i>Resistencia a carbapenémicos mediada por betalactamasas</i>	215
5.5. ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.....	220
5.6. RELACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA CON LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN ACINETOBACTER.....	222
5.7. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN CEPAS GENÉTICAMENTE RELACIONADAS Y CEPAS ESPORÁDICAS.....	227
6. CONCLUSIONES.....	230
7. BIBLIOGRAFÍA.....	234

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. HISTORIA DEL MICROORGANISMO: TAXONOMÍA.

Los organismos actualmente incluidos dentro del género *Acinetobacter* han sufrido una larga historia de cambios taxonómicos y se les ha denominado al menos con 15 nombres genéricos diferentes, destacando: *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Moraxella glucidolytica* y *Moraxella lwoffii* (Bergogne-Berézín, 1996).

El género *Acinetobacter* está constituido por cocobacilos gramnegativos, no formadores de esporas, aerobios estrictos, inmóviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C a 30°C, y son capaces de crecer en los medios de cultivo habituales, sin requerimientos especiales. En la mayoría de pruebas bacteriológicas actúan como inertes. Pueden oxidar la glucosa y otras aldosas.

En el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey se le clasifica dentro de la Familia *Neisseriaceae* e incluye una única especie: *Acinetobacter calcoaceticus*. Sin embargo estudios taxonómicos más recientes proponen que se incluyan dentro de la nueva familia *Moraxellaceae* junto con los géneros *Moraxella* y *Psychrobacter* (Rossau, 1991).

Dentro del género *Acinetobacter* se han incluido diferentes biovariedades, especies o grupos de ADN, destacando la especie *A. calcoaceticus* propuesta en el Manual Bergey (Juni, 1984). En 1986, Bouvet y Grimont describen 12 especies (1 a 12) dentro del género *Acinetobacter*: *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* y *A. lwoffii* y las otras 6 quedan sin nombre. En 1989, Bouvet y Jeanjean proponen otras 5 especies (13-17) y Tjernberg y Ursing encuentran 15 especies, las doce de Bouvet y Grimont y proponen además 3 especies nuevas. Posteriormente se han descrito otras posibles especies

todavía sin clasificar. Las especies de *Acinetobacter* descritas hasta este momento se encuentran en la tabla 1.1. Las genospecies 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 (sin nombre) y TU13 (sin nombre) son muy similares fenotípicamente aunque sean diferentes genotípicamente y algunos autores las denominan complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Gerner-Smidt, 1991). Dentro de este complejo se incluyen también otras dos especies: una de ellas se parece mucho a la genospecie TU13 (*parecido a TU13*), la otra se encuentra entre los aislamientos 1 y 3 (*entre 1 y 3*) (Ibrahim, 1997).

Tabla 1.1.

Especies genómicas de acuerdo con la homología del ADN, según los estudios de Bouvet y de

Tjernberg y Ursing.

Especies	Bouvet	Tjernberg y Ursing
<i>A. calcoaceticus</i>	1	1
<i>A. baumannii</i>	2	2
Sin nombre	3	3
Sin nombre	NA	13TU
<i>A. haemolyticus</i>	4	4
<i>A. junii</i>	5	5
Sin nombre	6	6
<i>A. johnsonii</i>	7	7
<i>A. lwoffii</i>	8	8TU
Sin nombre	9	8TU
Sin nombre	10	10
Sin nombre	11	11
<i>A. radioresistens</i>	12	12
Sin nombre	13	14TU
Sin nombre	14	NP
Sin nombre	15	NP
Sin nombre	16	NA
Sin nombre	17	NP
Sin nombre	NP	15TU

NA= no agrupable, NP = no probado

1.2. IMPLICACIÓN CLÍNICA DE ACINETOBACTER.

1.2.1. Especies de importancia clínica.

Los organismos del género *Acinetobacter* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiendo llegar a constituir el 0,001% del total de la población heterotrófica del suelo y el agua (Baumann, 1968). Por otra parte, este microorganismo forma parte de la flora normal de la piel humana y es capaz de colonizar transitoriamente el tracto respiratorio superior, sin que sea considerado patógeno para las personas sanas (Noble, 1978, Rosenthal, 1975; Taphin, 1963). Se encuentra en el medio hospitalario, y se le implica cada vez con mayor frecuencia como importante patógeno nosocomial, especialmente en enfermos inmunodeprimidos y en pacientes de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (Vila, 1989; Bergogne-Berézín, 1996).

Numerosos estudios indican que *A. baumannii* es la principal especie genómica asociada a brotes de infección nosocomial. En el estudio realizado por Bouvet y Grimont en 1987, se observó que en 291 aislamientos de 264 pacientes, el 84% (244 aislamientos) comprendían esta especie. No se conoce otro hábitat para esta especie que no sea el cuerpo humano. Su presencia en un objeto inanimado en el medio hospitalario puede interpretarse como una contaminación por parte de un paciente infectado.

Otras especies también pueden estar implicadas en la infección nosocomial, aunque en muchos casos pueden ser contaminantes del ambiente. El diagnóstico de infecciones por *Acinetobacter* “no usuales”, depende de las condiciones clínicas del enfermo y del aislamiento repetido de la misma cepa.

Las especies genómicas 3 y TU13 (pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus-baumannii*) se han asociado a brotes nosocomiales (Horrevorts, 1995), aunque la primera se ha encontrado tanto en muestras clínicas como en el suelo.

A. calcoaceticus está raramente asociado a infecciones humanas. Su hábitat original es el suelo.

A. haemolyticus se aísla ocasionalmente de pacientes, constituyendo el 3% aproximadamente del total de los aislamientos de *Acinetobacter* en el ambiente hospitalario. También se ha encontrado en aguas de alcantarillado.

A. junii ha sido aislado tanto en muestras clínicas como ambientales.

A. johnsonii puede aislarse del ambiente (suelos, ríos), animales, piel de personas sanas y aunque raramente, de muestras clínicas, como demuestra Seifert en 1993, al relacionar esta especie con varios casos de bacteriemia asociada a catéter.

Otras especies como *A. twoffii* y la geno especie 12 (*A. radioresistens*), habituales comensales de la piel, se han implicado, aunque con menos frecuencia, en infecciones nosocomiales (Bergogne-Berézín, 1996).

1.2.2. Infecciones causadas por *Acinetobacter*.

Las especies de *Acinetobacter* se han implicado en diversos tipos de infecciones. Aunque las infecciones por *Acinetobacter* adquiridas en la comunidad son muy frecuentes en algunos lugares geográficos, la mayoría de las infecciones por estos microorganismos son nosocomiales; tales como septicemias, neumonías, infecciones del tracto urinario, meningitis e incluso endocarditis. (Bergogne-Berézín, 1989; French, 1980; Ng, 1989). El tipo de infección

que produce no difiere del de otras bacterias gramnegativas nosocomiales, destacando las del tracto respiratorio inferior y del tracto urinario (Glew, 1977; Joly-Guillou, 1991; Joly-Guillou, 1992-a; Joly-Guillou, 1992-b).

1.2.2.1. Infección respiratoria.

El principal lugar anatómico de colonización e infección por *Acinetobacter* es el tracto respiratorio. Sin olvidar la dificultad que conlleva el discernir entre infección o colonización (Struelens, 1993), se ha demostrado el importante papel que desarrolla *Acinetobacter* en las neumonías nosocomiales, especialmente en pacientes de UCI que requieren ventilación mecánica (Dealler, 1998). En un estudio en el que se incluyeron pacientes sometidos a ventilación mecánica, y en el que se recogieron únicamente muestras respiratorias no contaminadas (obtenidas por fibrobroncoscopia), se observó que en torno al 20% de los episodios de neumonía incluían al menos un aislamiento de *Acinetobacter* (Fagon, 1989; Torres, 1990). Otros estudios sin embargo, hacen referencia a una frecuencia de infección respiratoria menor (3 a 5%) (Craven, 1990). La presentación clínica es frecuentemente multilobar, y en algunos casos pueden aparecer empiemas, cavernas o fistulas broncopleurales (Glew, 1977). La tasa de mortalidad por neumonía nosocomial varía entre un 30 a un 75%, correspondiendo los valores más altos a este tipo de pacientes. Por otro lado, el pronóstico de estas infecciones es mucho peor que si es producido por otras bacterias grampositivas o gramnegativas, a excepción de *P. aeruginosa* (Fagon, 1989; Torres, 1990). Todos estos datos reflejan que la neumonía nosocomial causada por *Acinetobacter* spp. constituye, hoy en día, una complicación importante de la ventilación mecánica (Bergogne-Bérézin, 1991).

1.2.2.2. Infecciones del tracto urinario.

La orina es el segundo lugar más común de aislamiento de *Acinetobacter*. Se le ha aislado como causante de cistitis, pielonefritis agudas y crónicas, generalmente en pacientes con enfermedades urológicas o renales. La mayoría de las infecciones urinarias nosocomiales afectan a ancianos debilitados, a pacientes ingresados en UCI, y destacan especialmente en enfermos con sondas permanentes, con bastante frecuencia en cultivos mixto (Pedraza, 1993). Al mismo tiempo se ha observado su relación con enfermos que presentan obstrucciones urinarias.

1.2.2.3. Bacteriemias.

Acinetobacter spp., especialmente *A. baumannii* se puede considerar como único agente etiológico de bacteriemias, o formando parte de bacteriemias polimicrobianas. Los pacientes inmunocomprometidos son el grupo más afectado (Chen, 1991). El foco suele proceder de infecciones del tracto respiratorio inferior, apareciendo la mayor tasa de neumonía nosocomial durante la segunda semana de hospitalización (Peacock, 1988). Otros factores predisponentes incluyen el traumatismo y las quemaduras (Green, 1983; Graber, 1962; Ang, 1992). Se han descrito además casos de bacteriemias asociadas a heridas y bacteriemias relacionadas con catéteres (Seifert, 1993; Tilley, 1994).

La presentación clínica de la bacteriemia por *Acinetobacter*, en general, no es específica de esta especie, pero en muchos casos estos pacientes tienen una evolución desfavorable. En un estudio reciente desarrollado por Poutanen y col. (1997) se observó que de 24 casos el 62% de las bacteriemias por *Acinetobacter* tenían significado clínico; la mayoría de las infecciones

fueron nosocomiales y adquiridas en UCI. Un 42% de estos pacientes desarrollaron shock séptico que complicaba la bacteriemia y un 54% de ellos murieron. Así como en otros casos la bacteriemia por *Acinetobacter* no es más que el marcador de una enfermedad de base más severa, en este estudio se observó que estas infecciones parecían contribuir a la muerte en la mayoría de los casos (85%), siendo las variables más asociadas con el riesgo de mortalidad, la edad mayor de 65 años, el desarrollo de shock séptico y la presencia de coagulopatías (Poutanen, 1997).

Un segundo grupo importante a destacar es el de los neonatos, especialmente aquellos con bajo peso, con terapia antimicrobiana previa, o sometidos a ventilación mecánica. Algunos estudios han mostrado casos de bacteriemias por *Acinetobacter* spp. en recién nacidos en los que la evolución clínica fue fulminante (Regev, 1993).

Todos estos datos indican la importancia de *Acinetobacter* spp. como uno de los organismos causantes de infección nosocomial severa en UCI, incluyendo a las UCIs neonatales.

1.2.2.4. Meningitis.

Acinetobacter es un agente inusual causante de meningitis, que aparece de forma predominante como meningitis secundaria. Sin embargo se han descrito algunos casos de meningitis primaria, especialmente tras procedimientos neuroquirúrgicos o de traumatismo craneal (Berk, 1981; Siegman-Igra, 1993; Seifert, 1995). La presentación clínica no es diferente de cuando se produce por otros microorganismos más frecuentes. Pueden aparecer petequias y otros síntomas característicos, por lo que una mala interpretación de la tinción de

Gram puede conducir a un tratamiento inadecuado. Hasta 1967, la mayoría de los casos de meningitis por *Acinetobacter* eran adquiridos en la comunidad. Sin embargo, a partir de 1979, la mayoría eran infecciones nosocomiales, principalmente debidas a *A. baumannii*, con tasas de mortalidad en torno al 20%.

1.2.2.5. Otras infecciones.

Se han descrito casos de endocarditis por *Acinetobacter* tras intervenciones dentales o tras cirugía a corazón abierto. Las características clínicas de estas infecciones no difieren mucho de las producidas por otros microorganismos (Gradon, 1992). Al mismo tiempo se han hallado casos de peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria (Lye, 1991), colangitis, así como osteomielitis, e infecciones oculares tras traumatismo (Martin, 1988; Melki, 1992).

1.2.3. Patogénesis del microorganismo.

1.2.3.1. Factores predisponentes.

Existen varios factores de riesgo que predisponen a la infección severa por *Acinetobacter*, muchos de ellos son factores comunes a otros organismos que también causan infecciones nosocomiales. Los enfermos ingresados durante periodos prolongados con una enfermedad de base (tumores, quemaduras e inmunodepresión), con terapia respiratoria prolongada, con ventilación mecánica y con tratamiento antimicrobiano previo, o que han sido sometidos recientemente a cirugía mayor presentan una clara predisposición a adquirir una

infección por este microorganismo (Bergogne-Bérézin, 1996; Kaul, 1996). Otros factores como la edad avanzada, enfermedad pulmonar crónica, inmunodepresión, cirugía, uso de antimicrobianos, presencia de sonda gástrica o endotraqueal y tipo de equipo respiratorio pueden aumentar el riesgo de neumonía o colonización del tracto respiratorio inferior (Ramphal, 1979; Lortholary, 1995).

1.2.3.2. Factores de virulencia.

Las especies de *Acinetobacter* se consideran como patógenos de bajo grado, con limitada virulencia demostrada en ratones (Joly-Guillou, 1994). Sin embargo, estos microorganismos tienen ciertas características que les permiten incrementar la virulencia de aquellas cepas implicadas en infecciones. Tales características están relacionadas con la invasividad (capacidad del microorganismo de introducirse, multiplicarse y diseminarse dentro de los tejidos del huésped) y toxigenicidad (capacidad de producir sustancias tóxicas).

La invasividad de la bacteria puede estar en relación con sustancias de su superficie que la protegen de la fagocitosis, como es la cápsula polisacáridica, compuesta por L-ramnosa, D-glucosa, D-ácido glucurónico y D-manosa. De igual manera parece que la hidrofobicidad juega importante papel en la adhesión (Avril, 1991; Boujaafar, 1990).

La presencia de fimbrias, junto con la cápsula le permite adherirse a las células epiteliales humanas.

Se ha estudiado la producción de enzimas que dañan los tejidos. No se ha encontrado actividad ADNasa, elastasa, hemolisina, proteasa ni gelatinasa en la mayoría de los

aislamientos. Sin embargo, se han encontrado niveles significativos de butirato esterasa, caprilato esterasa, y leucin aryl amidasa en todos los aislamientos. Estos enzimas hidrolizan ácidos grasos de cadena corta y pueden estar involucrados en la producción de daño tisular a nivel de lípidos (Poh, 1985).

Aparte de poseer otros factores comunes a las bacterias gramnegativas, habría que destacar la habilidad que tienen estos microorganismos de captar el hierro, mediante la secreción de sideróforos, que les permite sobrevivir en el cuerpo humano (Echenique, 1992; Smith, 1990). Actis y col. observaron en 1993 que este género es capaz de secretar un sideróforo del tipo del ácido 2,3 hidroxibenzoico que podría actuar como factor de patogenicidad. Estos mismos autores argumentan que los sideróforos podrían competir con algunas proteínas del huésped por la captación de hierro esencial, e incluso podrían reaccionar con otros elementos formando radicales hidroxilo que dañan los tejidos. De esta manera se podría explicar la patogénesis de las infecciones respiratorias.

Respecto a la toxigenicidad de *Acinetobacter*, existen varios estudios sobre la producción de *Slime* por este microorganismo. Se ha observado en ratones que las cepas de *Acinetobacter* productoras de *Slime* incrementan la virulencia de otras bacterias gramnegativas, cuando éstas aparecen en infecciones mixtas. La relevancia de este estudio radica en que *Acinetobacter* se ha encontrado con gran frecuencia en cultivos mixtos, especialmente en muestras respiratorias y heridas (Obana, 1986).

Hay que destacar la producción del lipopolisacárido (LPS), componente de su pared celular, que puede tener efecto endotoxigénico a través del lípido A. Se ha demostrado que la

producción de toxina *in vivo* puede ser la responsable de los signos característicos de enfermedad y muerte tras la septicemia por *Acinetobacter* (Brade, 1983).

1.2.3.3. Persistencia en el ambiente hospitalario.

El interés de *Acinetobacter* como patógeno nosocomial cada vez es mayor, sin embargo poco se sabe acerca del reservorio natural y de su modo de transmisión.

Se ha observado que algunas cepas de *Acinetobacter* pueden sobrevivir en el ambiente hospitalario durante años. Una de las razones para tal persistencia podría ser la resistencia a los antibióticos, o bien la supervivencia en ambientes secos inanimados, así como en la piel de individuos sanos, del personal sanitario, etc. (Bergogne-Bérézin, 1991; Wendt, 1997; Rosenthal, 1994).

A diferencia del resto de bacilos gramnegativos, que son sensibles a la desecación *Acinetobacter* es bastante resistente, sobre todo las cepas que pertenecen al complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Jawad, 1996). Estas bacterias pueden sobrevivir durante horas al aplicarlas experimentalmente sobre la piel (Ayliffe, 1988) y además parecen resistir a la clorhexidina, cuando ésta se utiliza como desinfectante (Hammond, 1987). En un estudio reciente desarrollado por Wendt y col. (1997), se observó que las cepas de *Acinetobacter* aisladas de superficies secas eran capaces de sobrevivir más de 4 meses, a diferencia de las aisladas de superficies húmedas que sobrevivían peor. La resistencia a estas condiciones de sequedad puede promover la transmisibilidad de un brote, por lo que se puede sospechar del ambiente seco como reservorio de *Acinetobacter*, especialmente cuando aparecen brotes prolongados (Wendt, 1997).

Entre las superficies ambientales secas implicadas como fuente de transmisión, se puede incluir el equipo médico reutilizable, almohadas, sábanas y otros componentes de las camas de los hospitales, guantes, etc. (Sherertz, 1985; Weernink, 1995). El uso incorrecto de guantes puede servir de vehículo de transmisión del microorganismo entre los diferentes pacientes, como se ha observado en el estudio realizado por Patterson y col. (1991). En este estudio demuestran mediante la aplicación de métodos de tipado la presencia de la misma cepa de *Acinetobacter* en pacientes sintomáticos y en los guantes del personal que los atienden.

Aunque *Acinetobacter* por su gran ubicuidad está ampliamente distribuido por la naturaleza y forma parte del ambiente inanimado hospitalario (Cunha, 1980), algunos estudios hacen referencia al reservorio humano como la principal fuente originaria de brotes hospitalarios. Este microorganismo se ha aislado de la piel, del tracto respiratorio y gastrointestinal (Timsit, 1993; Bergogne-Bérézin, 1987; Al-Khoja, 1979). La piel de los pacientes ingresados y del personal hospitalario han sido implicados en la transmisión del microorganismo produciendo brotes nosocomiales (Bergogne-Bérézin, 1995; Bergogne-Bérézin, 1991). Castle (1978) halló una cepa epidémica causante de un brote hospitalario en las manos del personal, antes y después del lavado. Este hecho unido al de la existencia de portadores crónicos, da una mayor importancia a la transmisión de *Acinetobacter* a través del contacto indirecto con las manos del personal sanitario. La elevada incidencia de colonización por *A. baumannii* puede ser atribuida a la contaminación cruzada y al uso de antibióticos de amplio espectro. Parece ser que los pacientes colonizados son la mayor fuente de transmisión de cepas epidémicas por el hospital (Mulin, 1995).

Se ha sugerido como ruta de transmisión el aire. Allen y Green (1987) fueron los primeros autores que consideraron el aire como ruta de transmisión de *Acinetobacter*. Este

dato se confirmó posteriormente cuando se encontró esta bacteria simultáneamente en el aire y en las manos del personal (Gerner-Smidt, 1987). De nuevo se consideró esta ruta de transmisión al comprobarse cómo algunas cepas de *Acinetobacter* implicadas en brotes persistían en ambientes secos hospitalarios, tras la completa desinfección de las áreas clínicas (Jawad, 1996).

Otro medio de supervivencia de *Acinetobacter* en el ambiente hospitalario es su capacidad de resistir a los metales y sales, muchas veces incluidos en desinfectantes y otras sustancias de uso hospitalario. Dhakephalkar y col. observaron en 1994, que las cepas ambientales tienen mayor resistencia a los metales que las cepas procedentes de muestras clínicas, de esta forma diferencian las patógenas de las no patógenas.

1.2.4. Terapia de las infecciones por *Acinetobacter*.

No existe ninguna guía terapéutica para los síndromes específicos producidos por *Acinetobacter*. Las infecciones localizadas que afectan a enfermos inmunocompetentes pueden responder a la retirada del cuerpo extraño o al debridamiento, sin la necesidad del uso de agentes antimicrobianos.

Las infecciones moderadamente severas responden a la monoterapia, siempre y cuando se instauren tratamientos cortos, cuando se alcancen concentraciones adecuadas del antimicrobiano, o cuando la terapia combinada quede limitada por la penetración de la droga.

El manejo de las infecciones graves se basa en tratamientos combinados, generalmente en la asociación de un carbapenémico y un aminoglucósido. El uso de terapias combinadas depende de los estudios previos de sinergia *in vitro*, de la experiencia clínica y de la aparición de resistencia

antibiótica durante el curso del tratamiento (Tankovic, 1994; Anstey, 1992; Chow, 1988; Kosmidis, 1986; Allen, 1995; Carlquist, 1982).

A pesar de que existen casos de bacteriemias transitorias por *Acinetobacter* resueltas espontáneamente sin la instauración de un tratamiento antibacteriano (Raz, 1982), se debe considerar que casi todos los aislamientos de *Acinetobacter* en sangre son significativos, y hay que tomar las medidas oportunas (Seifert, 1992). Se debe eliminar cualquier dispositivo intravascular (catéteres, etc.) y seleccionar el antibiótico adecuado en función de los resultados de sensibilidad *in vitro* (Rolston, 1985). La duración del tratamiento es similar a otras bacteriemias por bacilos gramnegativos, entre 10 y 14 días.

Las meningitis por *Acinetobacter* responden bien a la combinación de un betalactámico y un aminoglucósido, seleccionados en base a las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Algunos autores hacen hincapié en el empleo de aminoglucósidos por vía intratecal obteniéndose resultados óptimos (Berk, 1981; Rahal, 1982). Otros autores sin embargo prefieren el uso de fluorquinolonas o de imipenem/cilastatina (Schonwald, 1989; Segev, 1990; Rodriguez, 1985). La polimixina B es inadecuada como agente intraventricular en el manejo de ventriculitis postneuroquirúrgica, ya que puede causar meningitis química (Simon, 1994).

No es necesario eliminar el catéter a los pacientes con peritonitis CAPD por *Acinetobacter*. Ya que muchos de estos pacientes tienen cultivos positivos sin signos de peritonitis, la decisión de instaurar un tratamiento antimicrobiano debe ser individualizada. Se han observado casos de erradicación del microorganismo al emplear fluorquinolonas orales, aminoglucósidos vía intraperitoneal, o combinando ambos agentes (Said, 1980; Valdez, 1991; Chan, 1989). De cualquier modo, la elección del antibiótico dependerá siempre de las pruebas de sensibilidad *in vitro*.

1.3. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.

1.3.1. Identificación a nivel de género.

Los aislamientos de *Acinetobacter* se pueden identificar por la reacción de la tinción de Gram (coco-bacilos o a veces bacilos cortos gramnegativos), por el aspecto de la colonia en los diferentes medios de cultivo, por ser oxidasa negativos y catalasa positivos, por su inmovilidad, por no fermentar la glucosa (un gran porcentaje de aislamientos) y por ser inertes en la mayoría de pruebas bioquímicas.

Estos microorganismos crecen como colonias blanco-grisáceas a amarillo pálido, mucosas y de tamaño similar a las de las enterobacterias. Algunas especies, sobre todo las pertenecientes a la geno especie 4 (*A. haemolyticus*), pueden mostrar hemólisis en agar sangre de carnero. En la figura 1.1 se observa el aspecto de las colonias de *Acinetobacter* en agar sangre.

Acinetobacter crece en la mayoría de los medios de cultivo, como es el agar nutritivo o agar tripticosa soja. Sin embargo, para su aislamiento a partir de muestras clínicas contaminadas o de muestras ambientales puede estar recomendado el uso de medios diferenciales o selectivos que inhiban el crecimiento de otros microorganismos. Tal es el caso del medio comercial agar *Herellea*, que contiene sales biliares y antibióticos (Holton, 1983). El medio *Acinetobacter* *Leeds* ha demostrado ser útil para el aislamiento de *Acinetobacter*, tanto de muestras clínicas como ambientales (Jawad, 1994).

Hay que considerar la temperatura de cultivo, pues aunque la mayoría de las especies de los grupos 2 (*A. baumannii*), 3 ó *TU13* crecen bien a 37°C, otras especies genómicas crecen sólo a temperaturas más bajas, por lo que la temperatura de 30°C es la recomendada.

La identificación a nivel de género se puede confirmar con métodos comerciales, como los sistemas API 20 NE, Vitek y Microscan.

El sistema Microscan mediante la utilización de 23 pruebas bioquímicas permite diferenciar únicamente la especie de *A. lwoffii* del resto de especies de *Acinetobacter*, englobándolas como *Acinetobacter anitratus/haemolyticus*. En la figura 1.II se muestra un ejemplo de identificación de *Acinetobacter anitratus/haemolyticus* mediante el sistema Microscan.

Un método comercial muy utilizado en la mayoría de los laboratorios, por su simplicidad y aplicabilidad en la práctica diaria, es el sistema API 20 NE (BioMérieux, Francia). Este sistema, que contiene 12 reacciones de asimilación, incluye en su base de datos 5 especies: *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii* y *A. johnsonii*-*A. junii*. Sin embargo parece ser que presenta problemas de reproducibilidad y sensibilidad (Kropec, 1993). Bernards en 1996 estudió la capacidad del API 20 NE para identificar 130 cepas pertenecientes a las 18 especies genómicas. Un 45% del total de los aislamientos presentó una correcta identificación. Todas las cepas pertenecientes a *A. baumannii* y a *A. haemolyticus* se identificaron correctamente, mientras que se identificaron 3 de 5 *A. junii*, 3 de 8 en el caso de *A. johnsonii* y 11 como *A. lwoffii* de los 13 incluidos en el estudio. El resto de cepas se identificaron correctamente a nivel de género pero no se incluyeron en la genoespecie correcta. De éstas la mayoría se identificaron erróneamente como *A. baumannii*, perteneciendo casi todas ellas a las genoespecies 1, 2, 3 y 13TU. Con estos resultados, se consideró que el sistema API 20 NE es

insuficiente para lograr una correcta identificación de las especies genómicas de *Acinetobacter*. De acuerdo con otros autores (Horrevorts, 1995, Weernink, 1995), se hizo hincapié en la gran dificultad para identificar las especies incluidas dentro del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*, por lo que se sugirió la inclusión de este complejo dentro de la base de datos del sistema API 20 NE, para que de esta forma se hiciera el sistema más fiable.

1.3.2. Identificación a nivel de especie.

El método definitivo para identificar los aislamientos de *Acinetobacter* es el método de hibridación ADN-ADN, que ha permitido su clasificación en las 12 especies genómicas anteriormente mencionadas.

Bouvet y Grimont en 1986, además de la clasificación en las 12 especies obtenidas por hibridación de ADN, estudiaron las características fenotípicas de los aislamientos incluidos en cada grupo. Para ello propusieron un esquema de identificación basado en 28 pruebas bioquímicas que incluía 19 pruebas de asimilación de fuentes de carbono, 6 pruebas bioquímicas que incluían producción de hemólisis en agar con 5% de sangre, oxidación de la glucosa, licuefacción de la gelatina y tres pruebas de crecimiento a 37°C, 41°C y 44°C, (Bouvet, 1986). Según estas pruebas se pudo identificar cada especie por sus características fenotípicas, a excepción de las especies 8 y 9. *A. baumannii* se distinguió del resto por ser la única especie capaz de crecer a 44°C. Posteriormente se ha comprobado que estas pruebas resultan insuficientes para distinguir las diferentes especies.

Por este mismo método Gerner-Smidt en 1991 fue capaz de identificar correctamente el 78% de las 198 cepas analizadas previamente por hibridación de ADN. Hubo un 7% de cepas identificadas erróneamente y un 22% de cepas no identificadas, siendo difícil la

diferenciación de las cepas dentro del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* (Gerner-Smidt, 1991). Algunos aislamientos del grupo 13 pudieron crecer a 44°C, con lo que no se pudieron distinguir de *A. baumannii*, otros crecieron a 41°C y no a 44°C, por lo que no se pudieron distinguir de la especie 3. La mayoría de aislamientos del grupo 13 correspondieron al biotipo 9 de Bouvet y Grimont.

Las especies de los grupos 1, (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 y 13 tienen características bioquímicas comunes. Los aislamientos del grupo 13 tienen capacidad de crecer a 44°C en un 73-100%. Por otro lado un 15% del grupo 3 también puede hacerlo, dependiendo del medio empleado (Gerner-Smidt, 1994).

Los cinco nuevos grupos descritos en 1989 por Bouvet y Janjean son bastante similares fenotípicamente a los grupos 4 y 6 descritos en 1986 por Bouvet y Grimont.

La especie 5 (*A. junii*) se diferencia de *A. johnsonii* y *A. lwoffii* por la producción de hemólisis. Estas 3 especies se pueden distinguir además por el crecimiento a 37°C y las asimilaciones de L-histidina y azelato, como podemos observar en la tabla 1.2.

Tabla 1.2.

Diferenciación fenotípica de las especies de *Acinetobacter*.

	<i>A. junii</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. lwoffii</i>
Crecimiento a 37°C	+	-	+
Hemólisis	+	-	-
Asimilación de L-histidina	+	-	-
Asimilación de azelato	-	-	+

El crecimiento a diferentes temperaturas es una característica que depende del medio empleado. Así, como ejemplo, *A. johnsonii* y la especie 11 no crecen en BHI a 37°C, mientras que en TSB no crece *A. johnsonii* pero sí la especie 11.

Como ya se ha comentado anteriormente, el sistema API 20 NE no es un buen método de identificación a nivel de especie, aunque sí de género.

Otro sistema API, el ATB 32GN, que incluye 32 pruebas de asimilación, no mejora los resultados.

El sistema Biolog Microplate, con 95 reacciones de asimilación, también ha sido evaluado. Bernards (1995) estudió 129 cepas de *Acinetobacter* identificados por hibridación de ADN, y aunque los resultados parecían ser prometedores, al compararlos con el esquema de Bouvet y Grimont se observó que se pudo identificar únicamente *A. johnsonii*, y sólo un 83% se identificaron correctamente a nivel de género.

La dificultad que engloba la identificación a nivel de especie mediante pruebas fenotípicas, basadas sobre todo en reacciones de asimilación de fuentes de carbono, ha llevado en algunas ocasiones, a confusiones en la taxonomía. Hasta ahora no disponemos de un

sistema definitivo de identificación fenotípico, que establezca distinción a nivel de grupos de ADN. Por ello algunos autores recomiendan que a la hora de informar una especie de *Acinetobacter* se debería indicar el método de identificación empleado, e informar el resultado como identificación presuntiva (Weaver, 1994).

Todas estas dificultades han obligado a emplear técnicas de hibridación de ADN un tanto laboriosas, por lo que cada vez más se están desarrollando nuevos métodos de identificación basados en biología molecular, y están siendo evaluados frente a las técnicas de hibridación.

Se están empleando métodos basados en la secuenciación de los genes *16S ARNr* o el gen *gyrB* (Ibrahim, 1997). La ribotipia ha demostrado ser de gran utilidad para identificar los aislamientos de *Acinetobacter* spp., especialmente para diferenciar las especies del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* (Gerner-Smidt, 1992).

Recientemente se han utilizado diferentes métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa, entre los que se pueden destacar: el método ARDRA, polimorfismo de la región del *spacer* 16S-23S, ARNt o AFLP. Todos ellos son menos complejos, más rápidos y pueden realizarse en muchos laboratorios clínicos.

El análisis de restricción de un fragmento amplificado del ADN ribosomal (ARDRA, *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) se basa en la restricción mediante diferentes enzimas de un fragmento de unas 1500 pb, amplificado por PCR, dando lugar a una serie de patrones.

Mediante este método se distinguen bien los aislamientos de los grupos de ADN del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii*, que son difíciles de distinguir por pruebas

fenotípicas. Se ha comprobado por hibridación de ADN que estos grupos están más estrechamente relacionados entre ellos que con el resto de especies genómicas.

Sin embargo no distingue entre los grupos 4 y 7, que aunque son muy diferentes por las pruebas fenotípicas presentan gran similitud en la secuencia del ADNr 16S. Los grupos 10 y 11 tampoco se pueden distinguir mediante este sistema. Sin embargo estos grupos, aunque son muy similares por las pruebas fenotípicas, se distinguen porque la especie 11 no acidifica la glucosa, ni crece a 37°C, y la especie 10 sí lo hace. De igual modo, los grupos 5 (*A. junii*) y 17 no pueden diferenciarse por este método. Entre ellos existe una similitud mediante hibridación de ADN inferior al 22%, pero se pueden distinguir fenotípicamente. Vaneechoutte y col. (1995) sugieren que con la adición a este método de 4 pruebas, hidrólisis de la gelatina, hemólisis, acidificación de la glucosa y crecimiento a 37°C, éste puede ser útil para identificar todos los aislamientos hasta el nivel de especie. No se ha logrado diferenciar los grupos 8 y 9 mediante este método, pero tampoco lo habían logrado Tjernberg y Ursing en 1989 con hibridación de ADN.

El estudio del polimorfismo de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S (*ARNr16S-23S spacer*) permite amplificar entre 1 a 3 fragmentos de 390 y 4.500 pb por cepa. La mayoría de los aislamientos tienen perfiles característicos. No permite distinguir entre las especies 5 (*A. junii*), 7 (*A. johnsonii*) y 10. En los aislamientos del complejo *A. calcoaceticus-A. baumannii* se amplifica una única banda de entre 975 a 1005 pb y es necesario analizar el fragmento con enzimas de restricción, para diferenciar cada geno especie (Nowak, 1995; Dolzani, 1995).

Otro método utilizado es el polimorfismo de los genes ARNt, mediante el cual se obtienen fragmentos amplificados idénticos o casi idénticos en cada especie. Sin embargo, no

diferencia las especies 1, 3 y “entre 1 y 3”, las especies 2, 13TU y “parecido 13TU”, las especies 8 y 9, las especies 6, TU15 y BJ17 (Ehrenstein, 1996). Se han aplicado otros métodos aunque con menos frecuencia, como PCR del gen *recA* o PCR multiplex (López-Brea, 1998).

Mediante el método AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) se diferencian bien las genospecies de *Acinetobacter*, especialmente se diferencian las cepas del complejo *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* y se demuestra que las genospecies BJ13 y TU14 son similares (Janssen, 1997). Este método se ha utilizado preferentemente con fines taxonómicos.

Figura 1.I.

Aspecto de las colonias de *Acinetobacter* spp. en agar sangre.

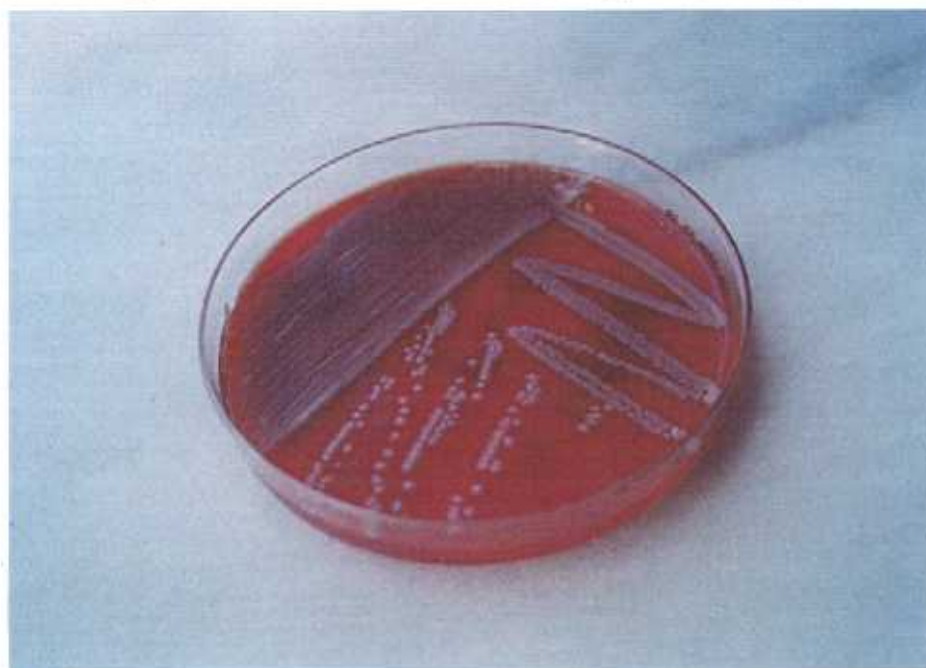


Figura 1.II.

Identificación de *Acinetobacter antratus/haemolyticus* mediante el sistema Microscan.



1.4. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ACINETOBACTER.

Los estudios epidemiológicos, efectuados con la finalidad de conocer la prevalencia y/o la diseminación de una bacteria en un ambiente determinado, exigen la caracterización del microorganismo más allá del nivel de especie. A menudo se aíslan en el ambiente hospitalario cepas epidémicas junto a cepas esporádicas. Mediante el tipado podemos caracterizar las cepas de manera más detallada, con la finalidad de discriminar entre unas y otras (Gerner-Smidt, 1994). El tipado además sirve tanto para caracterización como para identificación de cepas.

Las especies de *Acinetobacter* se pueden encontrar con gran frecuencia en muestras clínicas, debido a su elevada prevalencia en el ambiente hospitalario, y por formar parte de la flora de la piel y membranas mucosas. Por otro lado este microorganismo se ha implicado en diversas infecciones produciendo con frecuencia brotes nosocomiales. Es por ello por lo que la aplicación de un sistema de tipado eficaz sea de crucial importancia en la epidemiología de *Acinetobacter*.

1.4.1. Métodos de tipado.

Ante la sospecha de un brote ha de confirmarse lo más rápidamente posible para poder intervenir de manera apropiada. Para ello el tipado es de gran utilidad.

Los métodos de tipado que suelen emplearse en primer lugar para el estudio de un brote son los métodos fenotípicos, dado que se encuentran con mayor disponibilidad en los laboratorios de microbiología. Otros métodos, los métodos genotípicos, no tan fácilmente disponibles, se emplean generalmente como método confirmatorio de los anteriores. En

Acinetobacter se han utilizado numerosos métodos fenotípicos y genotípicos, sin embargo, no existe una única técnica de tipado aceptada ni estandarizada para estudios epidemiológicos de este microorganismo.

1.4.1.1. Métodos fenotípicos.

Se pueden utilizar métodos fenotípicos como biotipado, antibiotipado, serotipado, fagotipado, tipado con bacteriocinas o perfil de proteínas de membrana externa.

1.4.1.1.1. Biotipado.

Las cepas de *Acinetobacter* son metabólicamente inertes en la mayoría de pruebas bioquímicas utilizadas, de modo que habitualmente se identifican a nivel de género o de variedad en muchos laboratorios. La gran mayoría de aislamientos clínicos pertenecen a la variedad *A. anitratus* no proteolíticos y a *A. lwoffii*; casi todas las infecciones nosocomiales están causadas por la variedad *A. anitratus* (Gerner-Smidt, 1985; Gerner-Smidt, 1987; Gerner-Smidt, 1989). Los aislamientos que presentan hemólisis o hidrólisis de gelatina son muy poco frecuentes en las muestras clínicas. También existe variación en la producción de la ureasa entre los aislamientos de *Acinetobacter*; sólo son reproducibles las reacciones fuertemente positivas, que aparecen sobre todo en las especies *A. junii*, *A. lwoffii*, y las cepas del grupo 13. Por otra parte las tradicionales pruebas bacteriológicas discriminan muy poco entre las diferentes cepas hospitalarias.

Un sistema comercial, empleado habitualmente como método de identificación es el API 20 NE. A pesar de que no logra identificar las especies de *Acinetobacter* de acuerdo con

la nueva terminología, puede ser empleado como método de tipado. Towner y Chopade (1987) evaluaron este sistema con el que tiparon 122 cepas de diversos hospitales recogidas durante 4 años. Se observó que el sistema tenía un elevado índice discriminatorio, aunque si se consideraba por separado la variedad *A. anitratus*, este índice era inferior. Al mismo tiempo estos autores calcularon que, si se tiene cuidado y se evitan contaminaciones en las tiras, la reproducibilidad de este sistema puede alcanzar el 100%. Por su parte, Kropec y col. (1993) consideran que este sistema es poco sensible y poco reproducible, posiblemente por los problemas de contaminación.

Las pruebas más útiles para el biotipado de *Acinetobacter* parecen ser las reacciones de asimilación. Estas reacciones presentan gran versatilidad para este microorganismo, ya que es capaz de utilizar un único agente como fuente de carbono o nitrógeno (Bauman, 1968; Dijkshoorn, 1990). Estas características fueron aprovechadas por Bouvet y Grimont con fines taxonómicos, y al mismo tiempo desarrollaron un sistema de tipado de *A. baumannii* (Bouvet, 1987), basado en la asimilación de levulinato, citraconato, L-fenilalanina, L-tartrato y 4-hidroxibenzoato (Tabla 1.3). Este método de biotipado se pudo utilizar además para tipar el complejo *A. calcoaceticus-baumannii* (Bouvet, 1990; Gerner-Smidt, 1991). Se obtuvieron 17 biotipos, mostrándose una reproducibilidad de 100%. La reproducibilidad del biotipado de Bouvet y Grimont fue posteriormente confirmada por Gerner-Smidt (1991), al estudiar 70 cepas no relacionadas epidemiológicamente. La principal desventaja del sistema es que sólo puede ser aplicado a los aislamientos del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*.

Tabla 1.3.

Biotipos definidos por Bouvet y Grimont (1987) y Bouvet (1990).

Sustratos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
levulinato	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
citraconato	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L-Phe	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
pOHbenzoato	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
L-tartrato	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+

1.4.1.1.2. Perfil de proteínas de membrana externa.

El análisis de proteínas de membrana se ha aplicado como método de tipado en *Acinetobacter*, mostrando resultados variables, tal vez debidos a las diferencias metodológicas entre los distintos laboratorios (Dijkshoorn, 1987-a; Giammanco, 1989). Dijkshoorn y col. en 1987, intentaron tipar, mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), 129 cepas de *Acinetobacter* procedentes de 16 pacientes ingresados. Observaron que en muchos de ellos, predominaba la misma cepa. Se comprobó, contrastando con datos epidemiológicos, que la presencia del mismo tipo de bacteria en diferentes pacientes se debía a una contaminación cruzada. Se pudo afirmar que este método, unido al manejo de información epidemiológica resultaba un método útil para estudiar la diseminación de *Acinetobacter* en el hospital. En otro estudio posterior, corroboraron de nuevo la utilidad del SDS-PAGE para diferenciar cepas que se agrupan en un mismo patrón y que parecían tener relación epidemiológica con cepas que no se agrupaban entre sí (Dijkshoorn, 1987-b). Los autores sugieren por tanto que esta técnica puede ser útil para el estudio de brotes hospitalarios, aunque la necesidad de una estricta estandarización a la hora de desarrollarla, y el largo tiempo

que lleva el realizarla impide que este método se considere de elección como método de rutina (Dijkshoorn, 1989; Dijkshoorn 1993; Dijkshoorn, 1996).

1.4.1.1.3. Otros métodos de tipado fenotípico.

Existen otros métodos de tipado fenotípico como el antibiotipado, serotipado, fagotipado o tipado con bacteriocinas.

Respecto al antibiotipado, presenta grandes inconvenientes. Uno de ellos es que puede no haber correlación entre los datos de CMI y los halos de inhibición de algún antibiótico. Puede ocurrir que los valores de CMI utilizados como puntos de corte en clínica no coincidan con los que se deberían usar con fines de tipado. Además hay que considerar que los caracteres de resistencia no siempre son estables, una cepa puede ganar o perder genes de resistencia con el tiempo (Marcos, 1994). Por todo esto, no es un método de tipado definitivo y además tampoco presenta un poder discriminatorio muy elevado. No debe, por tanto utilizarse aisladamente, debiéndose asociar siempre a un método de tipado estable.

De igual modo, los métodos mencionados anteriormente presentan grandes inconvenientes. El tipado por fagos es poco útil en *Acinetobacter*, ya que presenta una tipabilidad inferior al 80% (Giammanco, 1989). El serotipado, aunque es muy sensible, presenta un bajo poder discriminatorio (Traub, 1989), y por último el tipado basado en la producción de bacteriocinas tiene una tipabilidad muy baja y un bajo poder discriminatorio (Andrews, 1986).

1.4.1.2. Métodos genotípicos.

Entre los métodos genotípicos se han utilizado perfil de plásmidos, ribotipado, electroforesis en campos pulsados, y métodos basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (García-Arata, 1997; Grundman, 1997; Marques, 1997; Dijkshoorn, 1997).

Los métodos basados en PCR son rápidos y útiles para diferenciar cepas durante una situación de brote. Se han utilizado PCR con iniciadores arbitrarios, PCR que amplifican para regiones repetidas en el genoma de *Acinetobacter*, como son la rep-PCR (iniciadores *rep*: repetitivas, extragénicas, palindrómicas) o la ERIC-PCR (iniciadores *ERIC*: enterobacterias, repetitivas, intergénicas, consensus).

(Sheehan, 1995). Reboli en 1994, estudió un posible brote aplicando el biotipado, el análisis de plásmidos y la rep-PCR. De todos los métodos empleados la rep-PCR fue el único método que permitió diferenciar entre las cepas que producían el brote nosocomial y las cepas de aparición esporádica. La rep-PCR ha demostrado ser muy útil en la clasificación de las cepas dentro de un brote, mientras que al utilizar la ERIC-PCR unos autores encuentran excelente resultados y sin embargo para otros, los resultados no son tan claramente concluyentes (Presterl, 1997; Vila, 1996; Reboli, 1994; Snelling, 1996). Más recientemente, Grundman ha corroborado la utilidad de la rep-PCR y de otras técnicas basadas en la reacción de la cadena de la polimerasa para el tipado de microorganismos, siempre y cuando éstas se empleen en condiciones de extracción de ADN y de amplificación estandarizadas (Grundman, 1997).

Es importante considerar la electroforesis en campo pulsátil como método de tipado en *Acinetobacter*. Este método está basado en la generación de fragmentos de ADN cromosómico de gran tamaño, y posteriormente en su separación mediante una electroforesis.

La elevada capacidad discriminatoria de la técnica hace que sea recomendada por muchos autores como técnica de elección para tipaje, sin embargo el tiempo necesario de preparación de la muestra, así como la necesidad de disponer un dispositivo de electroforesis especial, constituyen una gran desventaja a la hora de utilizar esta técnica.

1.5. ACTIVIDAD *in vitro* DE DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.

La elevada multirresistencia de *Acinetobacter* conlleva a la dificultad de encontrar un fármaco eficaz que cubra las infecciones graves producidas por estos microorganismos, dando lugar en numerosas ocasiones al fracaso terapéutico.

Ciertos antibióticos como cefotaxima, ceftriaxona, piperacilina, ticarcilina, ciprofloxacino y sulfonamidas han mostrado actividad *in vitro* frente a algunos aislamientos clínicos de *Acinetobacter* (García, 1982; Rolston, 1986; Seifert, 1993; Vila, 1993), sin embargo la aparición de cepas resistentes ha dificultado su utilización.

Los antibióticos betalactámicos deberían emplearse siempre y cuando se realicen los estudios de sensibilidad *in vitro* adecuados. Algunos como ceftazidima, imipenem o meropenem pueden ser útiles en el tratamiento de las infecciones por *Acinetobacter*. Hasta el momento los carbapenémicos constituyen el fármaco de elección, ya que no existen muchos casos de resistencia a estos antibióticos. En numerosas ocasiones imipenem ha mostrado muy buena actividad *in vitro* (Okpara, 1994), presentando valores de CMI muy bajos (0,25 a 0,5 mg/L), incluso inferiores a los que presentaba frente a algunas enterobacterias (Soussy, 1990). MacGowan, en 1995 estudió la actividad inhibitoria y bactericida de imipenem y meropenem en 124 aislamientos clínicos de *Acinetobacter*, y a su vez comparó dicha actividad frente a diversos aislamientos clínicos de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de 2ª generación. Observó una actividad inhibitoria similar en ambos antibióticos para *Acinetobacter*, aunque mayor en el caso de meropenem para las enterobacterias, sin embargo imipenem mostró una mayor actividad bactericida frente a meropenem en las cepas de *Acinetobacter*. Otros estudios corroboran la actividad bactericida de imipenem,

mayor que la de otros betalactámicos, en cepas con diferentes perfiles de resistencia (Joly-Guillou, 1995).

La resistencia a gentamicina se ha observado en numerosas ocasiones, incluso se ha considerado la posibilidad de que algunas cepas resistentes a gentamicina hayan podido elevar la CMI a otros aminoglucósidos, aunque siempre dentro de unos niveles aceptables en suero (Seifert, 1993). Aunque la amicacina es el fármaco más activo en las infecciones por *Acinetobacter*, se ha documentado con gran frecuencia la aparición de cepas resistentes a este antimicrobiano. Para lograr la actividad bactericida en cepas con diferentes mecanismos de resistencia combinados, es necesaria la combinación de 2 o 3 antibióticos. Los aminoglucósidos muchas veces pueden utilizarse con éxito en combinaciones con un betalactámico efectivo. La asociación de amicacina o tobramicina con ceftazidima, imipenem o fosfomicina ha mostrado sinergia *in vitro*, dándose los mejores resultados con la combinación imipenem-amicacina en aislamientos de *Acinetobacter* resistentes a ambos fármacos (Wang, 1995; Rodríguez, 1996; Allen, 1995). Sin embargo en estudios aplicados sobre modelos de neumonías experimentales en ratones la asociación de imipenem con amicacina no mejoró la eficacia de imipenem en monoterapia, asimismo otros antibióticos como amicacina y doxiciclina utilizados en monoterapia fueron también eficaces, aunque menos que imipenem.

También se ha propuesto el uso de otras combinaciones como la asociación de betalactámicos con fluorquinolonas, así como combinaciones de fosfomicina con aminoglucósidos (Joly-Guillou, 1991).

Se han estudiado diversas combinaciones de inhibidores de betalactamasa con betalactámicos, y apenas se ha logrado una mejora en la actividad *in vitro* (Visalli, 1997).

Únicamente se ha observado gran actividad *in vitro* de ampicilina/sulbactam, así como en combinaciones de otros betalactámicos con sulbactam. Actualmente ampicilina/sulbactam mantiene su buena actividad frente a *Acinetobacter*, gracias a la acción bactericida del sulbactam. El propio sulbactam podría ser una alternativa a estas infecciones, aunque hay que tener cuidado con el uso de este fármaco, ya que se han descrito algunos casos de resistencia (Marques, 1997). Se ha demostrado en contadas ocasiones la actividad *in vitro* de otros inhibidores de betalactamasas, como ácido clavulánico y tazobactam utilizados sin combinar (Visalli, 1997).

Las cefalosporinas de 4ª generación son estables a la acción de las betalactamasas. Se ha demostrado su elevada actividad frente a bacilos gramnegativos resistentes a otras cefalosporinas de amplio espectro (Blahova, 1997). Lin en 1994 demostró la actividad *in vitro* de cefepima en el 60% de 24 cepas de *Acinetobacter*, que fue superior a otras cefalosporinas de 3ª generación, aunque menos que a ceftazidima y que a ciprofloxacino. Estudios posteriores apuntan el efecto bactericida de cefepima, así como de cefpiroma, utilizándolas a una concentración 8 veces superior a su CMI, y un efecto sinérgico al combinar dichos antibióticos con sulbactam (Aubert, 1996).

Rifampicina que presenta actividad *in vitro* frente a estos microorganismos se ha utilizado asociado a imipenem, teniendo gran éxito en las UCIs de Francia (Thornsberry, 1983; Bergogne-Bérézin, 1985). Estudios sobre modelos experimentales de neumonías en ratones utilizan nuevas combinaciones sinérgicas de rifampicina más inhibidores de betalactamasas, donde se incluye sulbactam y ácido clavulánico mostrando especial interés la asociación de rifampicina a sulbactam puesto que ha logrado el menor porcentaje de mortalidad en los animales incluidos en este estudio (Wolff, 1997).

Aunque polimixina B presenta excelente actividad *in vitro* frente a *Acinetobacter* (Wood, 1993; Obana, 1985), la relativa ineficacia de estos agentes en infecciones sistémicas limita su papel

terapéutico (Tunkel, 1995). Incluso se han descrito casos de resistencia a este fármaco en *Acinetobacter* (Ang, 1992), por lo que el uso de este tipo de antimicrobianos debería reservarse para tratar infecciones resistentes al resto de antibióticos.

Cada vez se están desarrollando más estudios de sensibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas hacia antibióticos no usuales para dichos microorganismos. Se ha demostrado la buena actividad *in vitro* que presenta azitromicina frente a especies de *Francisella*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, y *Acinetobacter* (Ellie, 1998; Reinert, 1995; Ferencz, 1998). Citron y col. (1998) recientemente demostraron la actividad bactericida de azitromicina a concentraciones 1 a 2 veces superiores a su CMI, en cepas de *Acinetobacter* multirresistente (incluso resistente a imipenem, con valores de CMI intermedios a ampicilina/sulbactam), implicadas en brotes hospitalarios. Por este motivo se consideró a este antibiótico como una buena alternativa terapéutica en infecciones por *Acinetobacter* multirresistente.

1.6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

1.6.1. Multirresistencia.

Durante los últimos 20 años *Acinetobacter* ha desarrollado un gran aumento de la resistencia antimicrobiana, tal que las infecciones producidas por estos microorganismos resultan muy difíciles de tratar.

Hasta el principio de los 70, las infecciones nosocomiales por *Acinetobacter* spp. se trataban con éxito con gentamicina, minociclina, ácido nalidíxico, ampicilina, carbenicilina, tanto en terapia sencilla como combinada, pero entre 1971 y 1974 se empezó a observar un incremento de la resistencia antimicrobiana. En 1975 se observaron porcentajes de resistencia en algunos aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. (García, 1983), muchos aislamientos se hicieron resistentes a los clásicos antimicrobianos más comúnmente utilizados, como aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación (cefalotina), y de mayor espectro (cefamandol), cefamicinas (cefotina), a la mayoría de los aminoglucósidos, cloranfenicol y tetraciclinas. Para otros antibióticos como cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima, ceftazidima), imipenem, tobramicina, amikacina, y fluorquinolonas, existen datos de sensibilidad controvertidos, aunque las CMI's están aumentando cada vez más. Imipenem sigue siendo el fármaco más activo. Hasta hace poco había mantenido una actividad del 100% y en algunos estudios ha permanecido como único agente sensible junto a las polimixinas. Desafortunadamente ya se ha documentado la aparición de brotes de aislamientos resistentes a imipenem en *Acinetobacter* spp. especialmente en U.C.I. (Tankovic, 1994; Go, 1994; Schubert, 1998; Corbella, 1998). La resistencia a imipenem se encuentra más asociada a las cepas identificadas como *A.*

baumannii, mientras que para *Acinetobacter* no *baumannii* se han hallado CMI's inferiores a 0.3 mg/l. En general, otras especies de *Acinetobacter* aisladas en el ambiente hospitalario, como *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, están menos implicadas en infecciones nosocomiales y son más sensibles a los antibióticos. *A. lwoffii* es más sensible a los betalactámicos que *A. baumannii*. *A. haemolyticus* es más resistente a aminoglucósidos y a rifampicina.

1.6.2. Perfiles de resistencia a betalactámicos.

A lo largo de los años se ha ido observando un incremento de la resistencia de *Acinetobacter* a la mayoría de los antimicrobianos, especialmente a las penicilinas y cefalosporinas. Se han realizado estudios de sensibilidad antimicrobiana con el fin de determinar qué antibióticos son los más útiles para distinguir los diferentes patrones de resistencia, de modo que el conocimiento del principal perfil permitiría controlar los problemas terapéuticos, así como un mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia implicados.

Joly-Guillou en 1988 estudió la sensibilidad a 14 antibióticos betalactámicos en 100 cepas de *Acinetobacter* aislados durante un período de 6 años, y definió cuatro fenotipos de resistencia según la sensibilidad a ticarcilina, piperacilina, cefotaxima y ceftazidima. El fenotipo I englobó al 5% de los aislamientos, que eran sensibles a los cuatro betalactámicos mencionados, aunque presentaban resistencia a aminopenicilinas, y cefalosporinas de primera y segunda generación. Al fenotipo II únicamente pertenecían diez cepas que eran resistentes a ticarcilina, y sensibles a cefalosporinas de tercera generación. El fenotipo III incluía a aquellas cepas sensibles a ticarcilina, con bajo nivel de resistencia a piperacilina, pero resistentes a cefalosporinas de

tercera generación correspondiendo a un 19%. El fenotipo IV agrupaba al 66% de las cepas resistentes a penicilinas y cefalosporinas. Se observó por tanto una elevada resistencia a carboxi- y ureido-penicilinas, y cefalosporinas, incluidas las de tercera generación, sin embargo otros betalactámicos como imipenem mantenían buena actividad *in vitro*, con valores de CMI 50/90 de 0,3/0,6 mg/l. Por otro lado, el ácido clavulánico asociado a ticarcilina logró disminuir significativamente la CMI de este betalactámico en un 70% de los aislamientos estudiados. En 1995, Bergogne-Bérézin, basándose en los perfiles de resistencia definidos en el estudio anterior, agrupó los aislamientos de *Acinetobacter* de diferentes hospitales, obtenidos durante los últimos cinco años. Imipenem seguía manteniendo una buena actividad *in vitro*, aunque dada la variable incidencia de cepas de *Acinetobacter* resistentes a este antibiótico, se añadió un patrón más en este estudio, el Grupo V, que incluía a aquellas cepas resistentes a los anteriores betalactámicos incluido imipenem. En los resultados de este estudio destacó la disminución de cepas resistentes a carboxipenicilinas (ticarcilina) y un mayor porcentaje de cepas resistentes a cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima, cefotaxima).

1.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.

1.7.1. Betalactamasas.

Las betalactamasas constituyen el principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos. Son enzimas fisiológicas elaboradas por un gran número de bacterias, que tienen como misión romper el anillo betalactámico, convirtiendo al antibiótico en una sustancia carente de actividad antimicrobiana.

Se ignora el papel de estas enzimas en la bacteria; se las supone relacionadas con la síntesis del glucopéptido, ya que de forma transitoria, rompen la propia pared bacteriana para intercalar los bloques de mureína necesarios para el crecimiento y multiplicación. Existen grandes analogías entre éstas y las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), lo que sugiere un origen común, así como funciones complementarias aun desconocidas.

Las betalactamasas se han encontrado en casi todas las bacterias, tanto gramnegativas como grampositivas, así como en levaduras, algas verde-azuladas, y en tejidos de mamíferos, aunque se desconoce el papel que desempeñan en organismos no bacterianos.

1.7.1.1. Detección de las Betalactamasas.

Los estudios de detección de betalactamasas están condicionados por su localización celular en las bacterias. En las grampositivas, son exoenzimas sintetizadas por la bacteria y liberadas al exterior donde inactivan al antibiótico extracelularmente. Son de naturaleza inducible, por lo que para que se produzca una cantidad detectable es necesario incubarlos previamente en presencia de

inductores. Sin embargo, las betalactamasas de las bacterias gramnegativas se localizan intracelularmente en el espacio periplásmico que está rodeado por la membrana externa. Esta membrana constituye una barrera para la penetración de sustratos y hace necesario la disrupción previa de las células, mediante perlas de vidrio o por sonicación, para su posterior detección.

Existen varios métodos de detección de betalactamasas, como son los métodos acidimétricos, iodométricos, microbiológicos y cromogénicos.

Los métodos cromogénicos son los más utilizados, ya que son los más rápidos y sensibles. La betalactamasa hidroliza una sustancia cromogénica que tiene en su estructura un anillo betalactámico, de tal modo que se forma un compuesto con un espectro de absorción de luz visible diferente al inicial. El método más utilizado es el de la hidrólisis de la nitrocefina. La nitrocefina es una cefalosporina que fácilmente se hidroliza dando lugar a un compuesto de color rojo ladrillo a partir del color inicial amarillo. Existen otras sustancias similares, también utilizadas como método de detección de betalactamasas, como es el de la hidrólisis del PADAC (*pyridium-2-azo-p-dimethylaniline chromophore*), una cefalosporinasa cromogénica, cuya hidrólisis se visualiza cuando alrededor de un cultivo se observa un halo decolorado.

1.7.1.2. Caracterización de las betalactamasas

1.7.1.2.1. Punto isoelectrico.

El punto isoelectrico (pI) es una propiedad característica de cada proteína. Es el punto de pH en que la carga neta de la proteína es cero, cuando ésta se somete a un campo eléctrico en un soporte gelificado, donde se ha establecido un gradiente de pH; es decir, cuando se somete al isoelectroenfoque. En este punto la molécula no aporta carga eléctrica y queda inmovilizada (enfocada) formando una banda bien definida. Mediante el isoelectroenfoque las proteínas se separan y alinean como bandas en la zona de su pI obteniéndose un alto grado de resolución, ya que existen fuerzas que impiden la difusión de las proteínas y las concentran durante su separación. Matthew y col. (1976) aplicaron esta técnica analítica para separar betalactamasas en finas capas de poliacrilamida. Cada betalactamasa debido a su naturaleza proteica tiene un punto isoelectrico determinado que le caracteriza y permite a su vez diferenciar si existe más de un tipo de enzima. Posteriormente se pueden aplicar diferentes métodos de detección de estas bandas de pI, siendo el más utilizado el método de la hidrólisis de la nitrocefina. El gel se cubre con una solución de nitrocefina y se observan bandas de color rojo ladrillo en cada zona de pI. Esta técnica de separación y tinción específica de betalactamasas permite demostrar incluso bajos niveles de actividad enzimática, de esta forma se pueden reconocer y comparar fácilmente las betalactamasas de las diferentes cepas. Las betalactamasas generalmente se enfocan como una banda principal seguida de bandas satélite. Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre ellas mediante inmunoisoelectroenfoque, utilizando antisueros frente al enzima altamente purificado, por lo que no se considera que sean artefactos de la técnica, aunque la razón de su aparición es aun desconocida

(Matthew, 1975). Los geles normalmente empleados son de poliacrilamida formando una matriz que permite su separación. Sin embargo hay betalactamasas que tienen dificultad de migrar a través de estos geles. Hood y col. (1989) describieron un nuevo tipo de gel para determinar el pI de las cefalosporinasas de *Acinetobacter*, que migraban con dificultad en los geles de poliacrilamida. Estos geles estaban compuestos por agarosa, urea y sorbitol (AUS). Observaron que el problema era inherente al uso de poliacrilamida como matriz de separación, tal vez debido al elevado peso molecular de las betalactamasas (mayores de 600 kD). Por otro lado se sugirió la posibilidad de que las enzimas fueran poco solubles, emplearon este nuevo sistema que incorporaba detergentes para solubilizar las enzimas. Realizaron un estudio comparativo con geles de poliacrilamida y AUS y observaron que las betalactamasas en los geles convencionales migraban directamente al cátodo, sin embargo en los geles AUS se produjo una separación adecuada en los diferentes pI. El uso de geles con agarosa ya se había descrito previamente para la resolución de proteínas de peso molecular mayor de 200 kD (Saravis, 1979). Vecoli (1983) ya había estudiado betalactamasas de bajo peso molecular en estos geles, mostrando una adecuada migración de las mismas. Hood (1989) realizó una modificación a los geles convencionales de poliacrilamida, a los que incorporó urea, pero se observó una mala migración y distorsión de las bandas, probablemente debido a la poliacrilamida. Por otro lado Olsson (1981) consideró que la presencia de urea podía afectar al pI dando valores diferentes a los reales. A pesar de la técnica descrita por Hood (1989), hoy en día se siguen utilizando principalmente los geles de poliacrilamida.

Otro problema a considerar en el isoelectroenfoque cuando se trata de betalactamasas de alto pI, es su proximidad al cátodo. Al utilizarse como cátodo la solución de NaOH 1M se puede hidrolizar la nitrocefina que se extiende sobre el gel y dificultar la visualización de las bandas. Este

problema se podría solucionar parcialmente cubriendo este área con un ácido débil antes de extender la nitrocefina (Hood, 1989).

Mediante el estudio del pI podemos clasificar las diferentes betalactamasas, aunque es necesario realizar otros estudios de caracterización complementarios, como son los estudios de perfil inhibitorio y de perfil de hidrólisis de betalactámicos.

1.7.1.2.2. Perfil de hidrólisis de betalactámicos.

Se denomina así a la actividad hidrolítica del enzima frente a diversos antibióticos betalactámicos. Este término da idea de la actividad del enzima. Para su estudio se suelen emplear técnicas espectrofotométricas un tanto complejas, por lo que se han desarrollado otras técnicas microbiológicas más sencillas, que permiten conocer el perfil de hidrólisis de manera cualitativa. Los métodos microbiológicos no sólo permiten detectar la hidrólisis de los antibióticos, sino que además se pueden utilizar para analizar nuevos antimicrobianos. Son bastante sensibles, aunque menos que los métodos espectrofotométricos (Livermore, 1996).

Mediante las técnicas espectrofotométricas se puede determinar la capacidad de hidrolizar los betalactámicos, y esto nos lleva a estudiar la cinética de las betalactamasas (Samuni, 1975; Waley, 1974). Mediante la determinación de los diferentes parámetros enzimáticos de cada betalactamasa, como es la velocidad máxima (V_{max}) para cada antibiótico, y la constante de Michaelis-Menten (K_m) o constante de afinidad del enzima por el sustrato, se podrán caracterizar y clasificar en su grupo correspondiente. Dada la dificultad del estudio del perfil de hidrólisis mediante métodos espectrofotométricos, se debe partir de unos requerimientos mínimos, como es el estudio del perfil de hidrólisis de la bencilpenicilina y de la cefaloridina o cefalotina (Bush, 1995). La

determinación del perfil de hidrólisis de otros betalactámicos para nuevas betalactamasas dependerá del fenotipo de resistencia de la cepa en estudio, siempre que sólo exista un tipo de enzima.

El perfil de hidrólisis como criterio de clasificación presenta la desventaja de que no puede establecerse el número de betalactamasas diferentes presentes en la bacteria, sólo su actividad globalmente considerada. Por otra parte, los valores dependen del método de preparación, del número de copias del plásmido y/o del estado de represión de las enzimas cromosómicas. Por ello, no debe utilizarse como único criterio de clasificación, ya que existen enzimas diferentes, particularmente las cromosómicas que muestran perfiles similares, pero sí es útil cuando se utiliza como complementaria de otras.

1.7.1.2.3. Perfil inhibitorio.

Estudiando la inhibición de la actividad hidrolítica de las betalactamasas éstas se pueden clasificar en diferentes grupos. Se puede estudiar la inhibición por antibióticos betalactámicos (ácido clavulánico, sulbactam, cloxacilina, etc.), que se suelen comportar como inhibidores competitivos o “suicidas”, o por otros agentes como EDTA, p-cloromercurobenzoato (pCMB), o iones cloruro. Para ello se establece el parámetro IC₅₀, que es la concentración de inhibidor requerida para inhibir el 50% de la actividad betalactamasa, o el porcentaje de inhibición, que se expresa respecto a la hidrólisis de nitrocefina, o de penicilina G, siendo en ambos casos del 100%.

El estudio de la inhibición por ácido clavulánico, sulbactam y otros inhibidores suicidas permite diferenciar las betalactamasas cromosómicas de las plasmídicas. El estudio de la inhibición por EDTA es fundamental a la hora de diferenciar las betalactamasas de tipo “metalo-enzima” del resto de enzimas que son las “serina-enzimas”. Las “metalo-betalactamasas” se unen e inactivan el

anillo betalactámico a través de un resto de ion Zn. El EDTA, como agente quelante, capta el ion Zn e impide su acción. El pCMB inhibe la actividad de aquellas enzimas con restos de cisteína, esenciales para su actividad, como es el caso de algunas betalactamasas plasmídicas de tipo oxacilinasas.

Se puede estudiar el perfil inhibitorio de manera cualitativa mediante el isoelectroenfoque. Para ello se cubre el gel con el inhibidor tras realizar la electroforesis y posteriormente se añade la nitrocefina. Si existe inhibición, las bandas de pI no se observan en el gel. La IC₅₀ se puede determinar mediante complejos métodos espectrofotométricos, o microacidimétricos. El método descrito por Papanicolaou en 1990 ha supuesto un gran avance. Es un ensayo en el que se mide fotométricamente la hidrólisis de la nitrocefina en presencia de 17 inhibidores. Este método es válido cuando la cepa contiene un enzima dominante. La automatización permite cuantificar el porcentaje máximo de inhibición de la hidrólisis de nitrocefina y el descenso de la inhibición con el tiempo (cuando el máximo supere el 25% de inhibición). Es importante ya que al correlacionar los resultados obtenidos con este método con la secuenciación de aminoácidos y el punto isoelectrónico, parece ser que el perfil de inhibición refleja alteraciones en la configuración del sitio activo de las betalactamasas.

1.7.1.3. Clasificación de betalactamasas.

Las betalactamasas son la principal causa de resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos y por ello han sido sujeto de estudios bioquímicos, microbiológicos y genéticos. Se han descrito más de 190 proteínas bacterianas con la habilidad de interactuar con una variedad de moléculas con anillo betalactámico, que pueden servir tanto de sustrato como de inhibidores.

Debido a la diversidad de características enzimáticas de las betalactamasas se han realizado numerosos estudios de clasificación.

A lo largo de la historia han existido muchas clasificaciones diferentes. Ya desde 1968 Sawai diferenciaba las cefalosporinasas y penicilinasas en función de su respuesta a diferentes antisueros. En 1973 Richmond y Sykes incluyeron en su esquema todas las betalactamasas de bacterias gramnegativas existentes en el momento y las agruparon en 5 grupos (I-V) en función del perfil de sustrato. Posteriormente Bush en 1989 incluyó los enzimas de todas las bacterias, siendo este el primer esquema que intentaba correlacionar propiedades inhibitorias y de sustrato con la estructura molecular, aunque ya desde 1980 Ambler las había agrupado en A, B, C, D en función de su estructura molecular, cuando sólo se conocían las secuencias de 4 aminoácidos. Es en este momento cuando se separan las “serina-enzimas” de las “metalo-enzimas”. El esquema de clasificación más reciente es el de Bush, Jacoby y Medeiros de 1995 en el que se pone al día el anterior esquema de Bush (1989), relacionándose con las secuencias de las betalactamasas posibles. Este esquema se correlaciona muy bien con el esquema de Ambler de 1980. En la tabla 1.4 se representa la clasificación de las betalactamasas según el esquema de Bush, Jacoby y Medeiros (1995).

Tabla 1.4.

Esquema clasificatorio de las betalactamasas (Bush, Jacoby y Medeiros (1995)).

Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Bush 1989	Richmond-Sykes (1973)	Mitsuhashi-Inoue (1981)	Clase molecular	Perfil de hidrólisis	Perfil inhibitorio		Enzimas
						CLA	EDTA	
1	1	Ia, Ib, Ic	Csas	C	CEF	-	-	AmpC, MIR-1
2a	2a	NI	Psas V	A	PENI	+	-	Psas (G+)
2b	2b	III	Psas I	A	PENI, CEF	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2b'	NI, excepto K1	Cxsas	A	PENI, CEF estrecho y amplio espectro, MONOB	+	-	TEM-3-TEM-26, SHV-2-SHV-6, K1 (<i>K. oxytoca</i>)
2br	NI	NI	NI	A	PENI	+-	-	TEM-30-TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	Psas IV	A	PENI, CARB	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	Psas II, Psas III	D	PENI, CLOXA	+-	-	OXA-1-OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	Ic	Cxsas	A	CEF	+	-	Csas ind. (<i>P. vulgaris</i>)
2f	NI	NI	NI	A	PENI, CEF, CBP	+	-	NMC-A (<i>E. cloacae</i>). Sme-1 (<i>S. marcescens</i>)
3	3	NI	NI	B	Mayoría BTL, incluido CBP	-	+	L1 (<i>S. maltophilia</i>), CcrA (<i>B. fragilis</i>)
4	4	NI	NI	ND	PENI	-	?	Psas (<i>B. cepacia</i>)

Csas: cefalosporinasas; Psas: penicilinasas; Cxsas: cefuroximasas; CEF: cefalosporinas; PENI: penicilinas; CARB: carbenicilina; CLOX: cloxacilina; BTL: betalactámicos; CBP: carbapenémicos; CLAV: ácido clavulánico; MONOB: monobactámicos; NI: no incluido; ND: no determinado.

1.7.1.4. *Betalactamasas en Acinetobacter* spp.

Goldstein afirmó en 1983 que las cepas de *Acinetobacter* son naturalmente resistentes a la mayoría de los betalactámicos, especialmente a ampicilina y cefalosporinas. Sin embargo en estudios anteriores (1972-77) la carbenicilina y las ureidopenicilinas (piperacilina) resultaron activas en un 70-80% de las cepas. La actividad de cefalosporinas de 3ª generación era variable, con gran sensibilidad a ceftazidima (Joly-Guillou, 1987). El rápido incremento de resistencia a carboxipenicilinas y en menor grado a ureidopenicilinas y cefalosporinas de 3ª generación hizo investigar la producción de diferentes enzimas inactivantes relacionadas con la resistencia antibiótica en *Acinetobacter*.

La producción de betalactamasas parece ser uno de los mecanismos implicados en la resistencia de *Acinetobacter* a los betalactámicos (Joly-Guillou, 1988). Joly-Guillou estudió la actividad betalactamasa de 100 cepas aisladas en Francia desde 1981-1986. El 80% fueron positivas, por lo que consideró que el mecanismo de resistencia a betalactámicos era predominantemente debido a estas enzimas inactivantes.

1.7.1.4.1. Cefalosporinasas

Las betalactamasas descritas en *Acinetobacter* se incluyen en distintos grupos dentro de la clasificación de Bush (1995). La mayoría de estudios acerca de las betalactamasas en *Acinetobacter* hablan del predominio de enzimas tipo cefalosporinasa (Joly-Guillou, 1988; Bergogne-Bérézin, 1995; Vila 1993). El carácter y naturaleza exacta de estas cefalosporinasas no está todavía lo suficientemente claro. Existe el acuerdo de que pertenecen al grupo 1, similares a las que producen *Proteus* spp. y *Citrobacter* spp., según el esquema clasificatorio de Bush (1995). Estas betalactamasas, con pI superior a 8, se caracterizan por ser “serina-enzimas”, no se inhiben por tanto por EDTA, ni por ácido clavulánico, pero sí por cloxacilina.

Desde 1977, se habla de las cefalosporinasas en *Acinetobacter*, como causantes de la resistencia a las cefalosporinas (Morohosi, 1977). Otros estudios posteriores, hacen referencia de nuevo a estas enzimas, todas ellas muy similares en cuanto a pI y peso molecular, aunque con cierta heterogeneidad entre unas y otras (Hood, 1989; Hikida, 1989; Blechschmidt, 1992). Perilli, en 1996, logra caracterizar alguna de estas enzimas con mayor detalle, demostrando sus diferentes propiedades cinéticas, con respecto al resto de cefalosporinasas del grupo 1. Asimismo considera que dentro de las cefalosporinasas de *Acinetobacter*, existen diferencias en las de *A. baumannii* y las de *A. lwoffii*.

1.7.1.4.2. Penicilinasas.

Se ha descrito en *Acinetobacter* otro tipo de enzimas, generalmente asociadas a las cefalosporinasas, como son las enzimas plasmídicas tipo TEM (TEM-1 y TEM-2), tipo CARB (CARB-5) y tipo OXA.

TEM-1 y TEM-2 son enzimas plasmídicas bien caracterizadas, encuadradas en la clase A grupo 2b, de la clasificación de Bush (1995). No sólo se han descrito en *Acinetobacter*, sino en la mayoría de las enterobacterias. Se encuentran codificadas por un plásmido que confiere resistencia a aminoglucósidos. Se caracterizan por tener un pI de 5,4 y por ser inhibidos por ácido clavulánico, sulbactam y no por cloxacilina.

CARB-5 se encontró hacia 1989 en algunos aislamientos de *Acinetobacter* con alto nivel de resistencia a ticarcilina (CMI de ticarcilina: >512 mg/l) y a otros betalactámicos, pero que eran sensibles a ticarcilina/clavulánico (CMI de ticarcilina/clavulánico: 128 mg/l). Estos niveles de resistencia se habían asociado previamente a las enzimas TEM-1, hasta que posteriormente se describió esta nueva betalactamasa, a la que se consideró responsable. La enzima CARB-5 es una carbenicilinasas a la que principalmente se atribuye la resistencia a ampicilina, ureidopenicilinas y piperacilina. Pertenece al grupo 2c, clase A, hidroliza la carbenicilina, se inhibe por ácido clavulánico, sulbactam y pCMB. Presenta un peso molecular de 28 kD y un pI de 6,3, que le diferencia de otras carbenicilinasas plasmídicas descritas en bacterias como *P. aeruginosa*. Por este motivo, se le denominó en un principio PSE. Los estudios de perfil hidrolítico y de inhibición han permitido diferenciarlas de otras betalactamasas de espectro ampliado que tienen el mismo pI, como es la CTX-1. Desde su primer hallazgo, en 1989, no se han descrito muchos casos de *Acinetobacter* portadores de este enzima plasmídico

Las oxacilinasas, enzimas pertenecientes al grupo 2d clase D (Bush, 1995), implicadas en la resistencia a las penicilinas isoxazólicas, también han sido descritas en *Acinetobacter*. Dentro de los cinco grupos de oxacilinasas, las OXA-2 y OXA-3 presentan propiedades muy similares. Una derivada de la OXA-3, la OXA-21 se ha descrito muy recientemente como la

primera enzima de su clase hallada en este microorganismo. La OXA-21 con un pI de 7, se encontró en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii* que además producía una betalactamasa TEM-1 y una cefalosporinasa cromosómica. La cepa presentaba resistencia a todos los betalactámicos excepto a ceftazidima, ceftriaxona, ceftizoxima y a imipenem, y el gen que la codificaba estaba localizado en un integrón (Vila, 1997).

1.7.1.4.3. Betalactamasas de espectro ampliado (BLEA)

Un especial interés tienen dentro de las enzimas plasmídicas las betalactamasas de espectro ampliado (BLEA). Desde un punto de vista clínico, la repercusión mayor es en la gran limitación terapéutica que condiciona su espectro de hidrólisis, sobre todo en infecciones en las que se consideran fármacos de elección. Por otro lado estas enzimas se han aislado de forma esporádica, luego su repercusión es variable. Joly-Guillou (1990) describió una cefalosporinasa con pI de 7.7 en un aislamiento de *Acinetobacter* resistente a ticarcilina, cefoxitina, cefotaxima y ceftazidima. El perfil inhibitorio de la betalactamasa era diferente (se inhibía por ácido clavulánico pero no por cloxacilina). Por otra parte la coincidencia en el tiempo, con la aparición de un brote por *Klebsiella* multirresistente, hizo pensar que estos aislamientos de *Klebsiella* podían haber transferido el plásmido. Por este motivo se consideró la posibilidad de que se tratara de una betalactamasa de espectro ampliado. No ha habido más datos acerca de esta ceftazidimasa, hasta que en 1993 se encontró este enzima en un 11% de los aislamientos de *Acinetobacter* obtenidos en un Hospital de Barcelona, a partir de diferentes fuentes epidémicas (Vila, 1993).

Al mismo tiempo se ha descrito muy recientemente la aparición de BLEAS tipo PER-1 en un 43% de cepas de *Acinetobacter* en Turquía. Parece ser que estas betalactamasas se están

extendiendo únicamente por este país, ya que no se han obtenido más datos sobre estas enzimas en otros lugares (Vahaboglu, 1997; Nordmann, 1998).

1.7.1.4.4 Resistencia a Carbapenémicos mediado por betalactamasas.

1.7.1.4.4.1. Carbapenemasas.

La aparición de cepas resistentes a imipenem puede plantear serias dificultades a la hora de tratar estas infecciones de *Acinetobacter* multirresistente. Aunque no hay demasiados casos existen betalactamasas implicadas en la resistencia a imipenem. La primera carbapenemasa encontrada en *Acinetobacter*, ARI-1, descrita por Paton y col. (1993), procedía de una cepa de *Acinetobacter baumannii* aislada en 1985 a partir de un hemocultivo. Este aislamiento presentó resistencia a todos los betalactámicos (incluido imipenem y cefalosporinas de 3ª generación). Se determinó por isoelectroenfoque su pI y se observó una banda de 6,65, junto a otras de pI mayor de 9, que parecían ser cefalosporinasas cromosómicas. ARI-1 ha sido asociada con la resistencia a imipenem, penicilinas y cefaloridina, pero no a las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación como cefuroxima, cefotaxima y ceftazidima. No se trata de una “metalo-enzima”, pues no se inhibe por EDTA; además no se inhibe por ácido clavulánico, ni por p-CMB. Posteriormente Scaife (1995), intentó demostrar la localización plasmídica de esta betalactamasa, logrando por primera vez la transferencia de la resistencia a imipenem a través de plásmidos, dentro del género *Acinetobacter*.

Desde la aparición de ARI-1, se han descrito otras betalactamasas que causan resistencia a imipenem, aún no bien caracterizadas. En Brasil se ha descrito una betalactamasa con pI de 7,4, 6,7 y 5,9 en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii*, que presentaba una CMI a imipenem de 8-12

mg/l. La actividad carbapenemasa se demostró en este enzima por la hidrólisis de imipenem mediante el método microbiológico (Costa, 1996).

En Argentina se ha descrito recientemente un brote (Brown, 1996) por cepas de *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos, con CMI a imipenem: 8-32 mg/l y a meropenem: 4-8 mg/l. En estas cepas encontraron la presencia de una betalactamasa de pI 5,8, 6,5 y 6,8. Los extractos se inhibieron por ácido clavulánico, por imipenem y por BRL42715. No se conoce aún la naturaleza “metalo-” o “serina-enzima”.

1.7.1.4.4.2 Oxacilinasas.

Las oxacilinasas son enzimas plasmídicas que pertenecen a la clase molecular D, y están incluidas en el grupo 2d de la clasificación de Bush (1995). Se caracterizan por su acción hidrolítica hacia las penicilinas isoxazólicas, y hacia otras penicilinas. Sin embargo, hasta muy recientemente no se les había implicado en la resistencia a carbapenémicos. El primer caso de oxacilinasas que confiere resistencia a imipenem ha sido publicado por Horstein y col. en 1997. Se trata de un enzima con un pI de 6,3 que afecta a las penicilinas isoxazólicas, a las cefalosporinas de 1ª, 2ª y aunque algo menos, a las de 3ª generación. Esta betalactamasa procedía de una cepa de *Acinetobacter baumannii* que presentaba una CMI a imipenem de 32 mg/l. Los estudios del perfil de hidrólisis y de inhibición permitieron encuadrarla en este grupo, demostrando a su vez que por la ausencia de inhibición por EDTA se trataba de una “serina-enzima”, a diferencia de la mayoría de las carbapenemasas descritas en otras bacterias.

1.7.1.4.4.3. Cefalosporinasas.

Las cefalosporinasas pueden jugar un papel en la modificación de la sensibilidad a imipenem cuando se combinan con otros mecanismos de resistencia como es la modificación de las OMPs o alteración de las PBPs (Dib, 1994).

Se han descrito casos de resistencia a imipenem en cepas de *Enterobacter*, debido a una hiperproducción de cefalosporinasas cromosómicas del grupo 1, que además de hidrolizar imipenem, presentaban una disminución de la permeabilidad celular (Bush, 1985; Then, 1988). De manera similar se describió en 1993 la aparición de dos aislamientos clínicos de *Enterobacter* en los que se demostró no sólo la hiperproducción de estas enzimas, sino que a diferencia de lo que ocurría en el caso anterior no se había producido una alteración de las proteínas de la membrana externa (Thomson, 1993).

1.7.1.5. Localización genética de las betalactamasas.

1.7.1.5.1. Betalactamasas cromosómicas.

Las betalactamasas cromosómicas son enzimas codificadas por genes estructurales del cromosoma bacteriano. El conjunto de genes implicados en la expresión y regulación de las betalactamasas cromosómicas se conoce como operón *bla* (Chamberland, 1989). Se han descrito principalmente en las gramnegativas, y son características de género y/o especie, por lo que, salvo las células que por mutación no producen betalactamasas, o el extracto no es activo sobre el anillo betalactámico, todas las cepas de un determinado género o especie serán productoras de una enzima similar (Wiedemann, 1989).

En la mayoría de las bacterias se expresan constitutivamente a niveles muy bajos, por lo que no contribuyen al nivel de resistencia. Sin embargo en algunas especies son inducibles (Bennett, 1993; Gootz, 1982). Se caracterizan porque su producción está sometida a un control negativo. Su producción sólo tiene lugar en presencia de un inductor y en ausencia de éste la producción está inhibida (reprimida). En toda la población bacteriana existen células portadoras de genes alterados por mutación. Si el gen mutado es el que codifica la producción de betalactamasa, la consecuencia puede ser una célula no productora, o bien una célula hiperproductora. Si se da hiperproducción, esto supone producción de mayor cantidad y se puede dar el paso a ser constitutivo o semiconstitutivo.

Las betalactamasas cromosómicas interesan en clínica por su papel limitante en la eficacia de los antibióticos y por la posibilidad de que, en el curso del tratamiento, causen resistencia adquirida por alteración de la regulación (hiperproducción) a los antibióticos de espectro ampliado (cefalosporinas de 3ª generación y monobactámicos). Se han descrito casos de fallo terapéutico a antibióticos a los que los microorganismos eran inicialmente sensibles (Beckwith, 1980; Sanders, 1983). En algunas especies como *E. coli* la hiperproducción es poco frecuente, en otras especies que expresan cefalosporinasa de producción inducible puede llegar a ser importante. El clínico ha de plantearse la posibilidad de que se seleccionen cepas hiperproductoras en pacientes hospitalizados y tratados con preparados poco inductores.

Existen inductores potentes, como imipenem, cefoxitina e inductores débiles, como aztreonam, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, y las ureidopenicilinas. Con un inductor potente, pero activo, existe poco riesgo de selección de mutantes, luego existe menor riesgo de causar resistencia. Sin embargo los inductores débiles seleccionan mutantes y al mismo tiempo son lábiles a

la acción del enzima, por tanto pueden dar lugar a la producción de cepas mutantes desreprimidas estables (Minami, 1980).

En un estudio sobre las betalactamasas inducibles de *C. freundii* (Appelbaum, 1994), se llegó a la conclusión de que la labilidad del antibiótico era un factor más importante en determinar si un compuesto seleccionaba o no mutantes desreprimidos, que el poder inductor de dicho compuesto. Se comprobó porqué inductores fuertes como cefoxitina e inductores débiles como cefotaxima y ceftazidima, seleccionaban mutantes desreprimidos, y sin embargo imipenem, que era potentemente inductor pero muy estable a la acción de las betalactamasas, apenas seleccionaba dichos mutantes.

El problema de las infecciones por cepas productoras de betalactamasas inducibles supone la necesidad de hacer seguimiento de la sensibilidad en el curso del tratamiento de estas infecciones, y ante un paciente infectado por una cepa hiperproductora, evitar la posibilidad de la difusión clonal de la misma.

Mediante las técnicas de difusión normalmente empleadas para realizar estudios de sensibilidad, no se pone en evidencia el carácter inducible de las betalactamasas. Para ello existen métodos de sensibilidad especiales (Huber, 1994). Sanders propuso en 1979 una prueba de difusión en disco, que consistía en colocar discos de cefoxitina al lado de los antibióticos a estudiar. Se consideraba inducción si se producía una reducción del halo de inhibición del antibiótico de más de 4 cm. Posteriormente Nadal (1993) sugirió emplear la misma técnica como rutina, modificando la distancia a más de 1 cm. Otros estudios más recientes recomiendan 2 distancias diferentes, entre 1,5 y 2 cm, ya que se ha comprobado que, de este modo, la seguridad de este método es superior al 90% (Livermore, 1996).

La producción de cefalosporinas cromosómicas por parte de las especies de *Acinetobacter* es un hecho muy estudiado. Sin embargo no está tan estudiado el que éstas se produzcan de manera inducible o constitutiva. Algunos autores intentan explicar la elevada resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Acinetobacter*, como consecuencia de la hiperproducción de betalactamasas inducibles, pero aún quedan muchos estudios pendientes por hacer, que demuestren si estas enzimas son inducibles, constitutivas, o bien si coexisten los dos tipos de enzimas en la misma bacteria (Morohosi, 1977; Bauerfeind, 1986; Blechschmidt, 1992; Danés, 1998).

1.7.1.5.2. Betalactamasas plasmídicas.

Así como la resistencia bacteriana a antibióticos, adquirida por mutación, será puntual y difícilmente transmisible, la resistencia adquirida por plásmidos o transposones puede ser múltiple a varios antibióticos y permite su transmisión por conjugación a otras bacterias de la misma o de diferente especie. La resistencia cromosómica, sólo se expresará mediante presión selectiva del antibiótico que pondrá de manifiesto la población resistente. Algunos genes de resistencia a antibióticos en forma no transferible pueden unirse a un plásmido transferible. La distinción, por tanto, entre enzimas mediadas por plásmidos y cromosomas no puede ser muy estricta debido a la posibilidad de translocación de genes entre los plásmidos y el cromosoma. Las betalactamasas plasmídicas tienen mucha importancia en cuanto a que permiten una mayor difusión de la resistencia bacteriana, lo que ha dado lugar a numerosos brotes epidémicos en el medio hospitalario.

Existe la evidencia de que la resistencia en *Acinetobacter* a las penicilinas, aminoglucósidos, tetraciclinas y sulfonamidas está mediada por plásmidos. En un aislamiento de *Acinetobacter* que presentaba resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomicina, sulfonamidas y trimetropin se demostró la presencia de un plásmido de 167 kb, que tras el curado de la cepa hizo perder la resistencia simultáneamente a todos los antimicrobianos. Se observó que este plásmido transportaba genes que codificaban el enzima TEM-1, así como la fosfotransferasa APH(3')(5') y la adeniltransferasa AAD(3)(9). De esta manera se pudo explicar la resistencia a ampicilina y a los aminoglucósidos, sin embargo el mecanismo de resistencia a cloranfenicol y a las sulfonamidas fue desconocido (Goldstein, 1983).

Este plásmido pertenece a un grupo de plásmidos ubicuos en la naturaleza y muy frecuentemente encontrados en otras bacterias, como son las enterobacterias, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae*. Este hecho hace pensar en la facilidad con la que este tipo de plásmidos se transfiere de unos géneros a otros, incluyendo por tanto, al género *Acinetobacter*.

Se han descrito otros casos de betalactamasas mediadas por plásmidos en *Acinetobacter*, como es el de ARI-1. Su enorme interés radica en que este enzima es responsable de la resistencia a imipenem además de a otros betalactámicos, y por primera vez tras su descripción en 1993, se logró transferir el plásmido que le codificaba a una cepa de *Acinetobacter junii* (Scaife, 1995).

Los integrones son elementos genéticos móviles implicados en la resistencia antimicrobiana. Recientemente se ha detectado en una cepa de *Acinetobacter* multirresistente la presencia de un integrón, cuya secuencia parcial demostró que poseía al menos dos genes de resistencia, uno que codificaba un enzima inactivante de aminoglucósidos (aad 2'), y otro que codificaba una betalactamasa de tipo oxacilinas (Vila, 1997). Se ha comprobado, además que algunos genes, que

codifican enzimas inactivantes de aminoglucósidos como es el gen de la AAD(3'') y de la AAC(3)-I (que inactivan estreptomicina y gentamicina respectivamente) son vehiculizados en un transposón (Devaud, 1982). Así pues, en *Acinetobacter* se puede producir fácilmente la adquisición de elementos genéticos móviles que conllevan múltiple resistencia (Rudant, 1998). La ubicuidad de este microorganismo y el hecho de que pueda sobrevivir durante tiempo en ambientes húmedos compartiendo su nicho ecológico con otros microorganismos facilitará la transferencia de material genético.

1.7.2. Alteración de la permeabilidad de la membrana externa.

1.7.2.1. Proteínas de membrana externa.

La pared celular de las bacterias gramnegativas está constituida por una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una bicapa lipídica asimétrica que forma la membrana externa. Entre esta membrana y la membrana interna o citoplasmática se encuentra el espacio periplásmico donde se localizan proteínas (betalactamasas) y polisacáridos aniónicos. La membrana citoplasmática actúa de barrera para la penetración de moléculas hidrófilas al citoplasma.

La membrana externa posee dos láminas lipídicas, una interna formada por fosfolípidos y otra externa que contiene el lipopolisacárido (LPS), de ahí la asimetría anteriormente referida. El LPS por su composición de ácidos grasos saturados contribuye a dificultar la difusión a través de esta membrana.

La estructura de la membrana externa constituye una barrera para la difusión de muchos compuestos nocivos para la bacteria (antimicrobianos, enzimas líticas, etc.), pero también dificulta la

penetración de nutrientes y eliminación de detritos. Para obviar esta situación posee unos poros de naturaleza proteica que permiten el paso de compuestos hidrofílicos.

Aproximadamente la mitad de la membrana externa está compuesta por proteínas, de las que cada especie posee entre 50 y 100 tipos distintos. De estas proteínas de membrana externa (outer membrane proteins, OMP), sólo unas pocas (menos de 5 a 10) tienen un número de copias en torno a 100.000 por bacteria, por lo que se denominan OMPs principales. Estas OMPs principales incluyen varios tipos funcionales de proteínas, como son las lipoproteínas, que contribuyen a la estabilidad de la membrana externa, y las proteínas formadoras de poros hidrófilos, entre las que distinguimos las porinas que forman poros inespecíficos, y los poros específicos (entre los que destacamos la OprD2 de *P. aeruginosa*), que facilitan la difusión de determinados compuestos.

Se han identificado y caracterizado más de 40 porinas en más de 32 especies bacterianas, dentro de 10 familias de bacterias gramnegativas. Aparte se han descrito también en mitocondrias, cloroplastos y más recientemente en micobacterias (Schulz, 1993). Se ha observado que su estructura es muy similar en todas ellas, incluso entre bacterias taxonómicamente diferentes. Las porinas son unas proteínas ácidas (pI cercano a 5) dispuestas en láminas β , con una parte hidrófoba (en contacto con el interior de la membrana externa), y otra hidrófila que forma unos canales acuosos de difusión, permitiendo la entrada de solutos hidrofílicos. El interior del canal de la porina contiene aminoácidos cargados cuyo número y posición determina la selectividad a los iones que lo atraviesan. Pueden ser selectivos a cationes o aniones. Esta selectividad refleja la mayor o menor facilidad de penetración de los antibióticos cargados (Hancock, 1987). Las porinas suelen existir en forma de trímeros y el tamaño del monómero suele oscilar entre 30 y 50 kDa. Están

asociadas por enlaces hidrófobos al LPS y al péptidoglicano y son muy estables, resistiendo la disociación por calor y detergentes como el dodecilsulfato sódico (SDS) (Hancock, 1987). El control de la producción de estas proteínas está estrechamente regulado por las condiciones ambientales (Martínez-Martínez, 1995).

En *E. coli* K-12 se han estudiado 3 OMPs principales (OmpA, OmpC y OmpF), de las que solamente se consideran las dos últimas como porinas. En otras especies de enterobacterias se han descrito múltiples tipos de OMPs, muchas de ellas similares a las de *E. coli* que, en principio, podrían ser las correspondientes porinas.

En el caso de los gramnegativos no fermentadores es algo diferente. Parece ser que producen tipos sencillos de porinas, características de cada especie. Se han identificado porinas en especies de: *N. gonorrhoeae*, *Aeromonas salmonicida*, *Brucella* spp., *C. trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulata*, *R. spliceroides*, *P. aeruginosa*. (Nikaido, 1985). En *P. aeruginosa* la principal OMP es una porina denominada OprF, que resulta poco eficaz puesto que en la mayoría de los casos impide la difusión de moléculas a través suyo. Sin embargo la OprD2 es la proteína más importante desde el punto de vista de resistencia antimicrobiana, y funciona como poro específico permitiendo el paso de aminoácidos dibásicos.

Existen pocos estudios acerca de las OMPs en *Acinetobacter*, que de comportarse como porinas podrían explicar la elevada resistencia antimicrobiana que presenta este microorganismo.

1.7.2.2. *Papel de las porinas en la permeabilidad de la membrana externa. Naturaleza porina de las OMPs.*

En la mayoría de los trabajos sobre permeabilidad de membrana externa se ha asumido el papel de las OMPs como porinas, tras su estudio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, pero en pocos casos se han obtenido preparaciones purificadas de OMPs que permitan estudiar verdaderamente sus propiedades funcionales y demostrar que la OMP perdida sea realmente una porina. Las porinas se pueden aislar por diferentes métodos, para posteriormente estudiarlas más a fondo. Nurminen (1978) ya había descrito un método de aislamiento de porinas, basado en la resistencia de éstas a la tripsina. Posteriormente, Nikaido (1983) utilizó un nuevo método de purificación de porinas que se basaba en la asociación no covalente de éstas al péptidoglicano. Martínez-Martínez en 1996, combinó ambos métodos para aislar las porinas de 4 aislamientos de *K. pneumoniae* productor de betalactamasa de espectro ampliado. Se comprobó cómo el material asociado al péptidoglicano y resistente a la acción de la tripsina, al separarlo por cromatografía y someterlo a electroforesis SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie, contenía una sola OMP de 35 kD. Para confirmar que la porina había quedado aislada observó, mediante electroforesis SDS-PAGE teñida con plata, que no contenía restos de LPS, por lo que se pudo demostrar la naturaleza porina de estas OMPs (Martínez-Martínez, 1996).

Una vez lograda la purificación de las OMPs, el ensayo más utilizado es el del hinchazón del liposoma. Se preparan proteoliposomas que contengan la OMP purificada y que en su interior contengan moléculas a las que son impermeables. Cuando estos liposomas se añaden a una solución isotónica de un soluto (azúcar, iones, antimicrobiano, etc) al que se supone va a ser permeable la porina, la penetración del mismo conlleva a la entrada de agua, produciendo el hinchazón de los

liposomas. Se origina de esta forma una disminución del índice de refracción de la suspensión, que puede medirse mediante espectrofotometría.

Otra forma de demostrar el papel de las OMPs como porinas, es mediante estudios de clonaje. Martínez-Martínez (1996) confirmó el papel de la OMP de *K. pneumoniae* como porina clonando el gen codificador en una cepa sin porinas y comprobando que la expresión de ésta hacía que la bacteria fuera sensible a cefalosporinas a las que era inicialmente resistente (Martínez-Martínez, 1996).

1.7.2.3. Resistencia a antimicrobianos por alteraciones de la membrana externa

La penetración de los antimicrobianos a través de las porinas depende en gran medida de sus propiedades físico-químicas, y en particular de la hidrofobicidad, del tamaño y de la carga eléctrica neta. El proceso no requiere energía y su velocidad es directamente proporcional a la concentración de antimicrobiano en el medio extrabacteriano (Nikaido, 1985).

Los betalactámicos menos hidrófobos, como son las cefalosporinas respecto a las penicilinas, penetran mejor a través de las porinas. El tamaño del antibiótico y de la porina es un factor importante en la difusión a través de estos canales proteicos. El efecto negativo del tamaño es mayor en las porinas de menor diámetro; se ha comprobado experimentalmente que, ceftazidima, cefoperazona y ceftriaxona, que difunden bien a través de OmpF, lo hacen mucho peor a través de OmpC, ya que ésta tiene menor diámetro (Nikaido, 1983).

La penetración también depende de la carga eléctrica de la molécula. Las cargas aniónicas inhiben el paso de las cefalosporinas, y este efecto es aún mayor al considerar las células completas.

En cambio moléculas pequeñas zwitteriónicas como ampicilina, y especialmente imipenem penetran fácilmente.

Existen otras vías de difusión a través de la membrana externa. El lipopolisacárido de la membrana externa permite la penetración de los antibióticos que tienen cierto grado de lipofilia (por ej. algunas quinolonas, tetraciclinas, etc.), penetrando solamente la fracción no cargada (Martínez-Martínez, 1995). Cuando se producen alteraciones del LPS la resistencia disminuye, pero hay pocos casos en los que la alteración del LPS esté directamente relacionado con la resistencia a antimicrobianos.

Otra posibilidad de difusión es la penetración por autopromoción. Los polímeros como la polimixina B interaccionan con los puentes de unión entre moléculas contiguas de LPS mediado por puentes divalentes (Nikaido, 1985), de modo que los desplazan de forma competitiva rompiendo la disposición fisiológica del LPS e incrementando la permeabilidad de gran número de moléculas, incluida la de ellos mismos.

Los betalactámicos, en general, utilizan preferentemente la vía de las porinas para penetrar en la bacteria. Las catecolcefalosporinas atraviesan la bacteria utilizando porinas específicas para complejos sideróforos-hierro (Curtis, 1988). Imipenem atraviesa la porina OprD2 de *P. aeruginosa* gracias a su analogía estructural con los aminoácidos dibásicos, el sustrato natural de este canal (Trías, 1990).

La disminución en el número o tamaño de las proteínas de la membrana externa (OMP) de las bacterias produce una disminución de la permeabilidad celular dando lugar a la resistencia a

muchos antibióticos, por ello la evaluación de la permeabilidad de las OMPs es indispensable para estudiar la eficacia de los betalactámicos (Novelli, 1995). Hay que considerar que un microorganismo nunca pierde completamente todas sus porinas y que la existencia de un número bajo de copias de porina podría aún permitir la penetración suficiente de antibiótico para inhibir su diana.

P. aeruginosa a pesar de poseer canales de porinas de grandes dimensiones, estos poros están abiertos en pequeña proporción, siendo ésta la razón predominante de la alta resistencia intrínseca que exhibe dicha especie frente a antibióticos betalactámicos (Nicas, 1983).

La membrana externa de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *P. cepacia* es del orden de diez a cien veces menos permeable a azúcares y antibióticos que la membrana externa de *E. coli*. (Nikaido, 1982?). En 1991, Sato y Nakae realizan un estudio en el que se determina el coeficiente de permeabilidad de cefalosporinas zwitteriónicas (cefalexina, cefaclor, cefazolina, etc.) hacia la membrana externa de *Acinetobacter*. Lo estudian en una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 19606, y observan que es de 2 a 7 veces menor que el coeficiente de permeabilidad del mismo antibiótico para *P. aeruginosa*, deduciendo que la membrana externa de *Acinetobacter* es incluso menos permeable que la de *Pseudomonas* spp.. Observan que esta cepa posee dos OMPs minoritarias (*minor*), una de ellas de 45 kD, que aparecen en una cantidad menor del 5% del total de sus proteínas de membrana externa. Mediante el estudio del hinchazón del liposoma identifican estas OMPs como porinas y observan que, el porcentaje de difusión de carbapenémicos y cefalosporinas zwitteriónicas hacia el liposoma que contiene la OMP es de 1-3%, si se compara con la membrana externa de *E. coli*. Estudian el tamaño del poro mediante la difusión de diversos azúcares hacia dicho liposoma observando que esta difusión es de un 10% respecto a la OmpF de *E. coli*. De todos estos resultados confirman su hipótesis de que la baja permeabilidad de

Acinetobacter a los antibióticos se debe a que poseen unas porinas de pequeño diámetro, producidas en una cantidad minoritaria, estando ambos fenómenos relacionados (Sato, 1991).

Obara y Nakae en 1991 de nuevo hablan de una disminución de la permeabilidad de la membrana externa hacia solutos hidrofílicos relacionada con la presencia de bajo número de porinas de tamaño pequeño. Seleccionan aislamientos mutantes resistentes a cefoxitina, cefoperazona y ceftazidima y comparan las porinas de éstos con las de las cepas parenterales, comprobando que existe la disminución de 46,5 kD en todos los mutantes.

1.7.2.4. Complementación entre impermeabilidad y mecanismos de inactivación o eliminación

La disminución de la permeabilidad de la membrana externa no produce necesariamente una subida de la CMI, si el betalactámico no está inactivado por otros mecanismos. El efecto de la permeabilidad disminuida se incrementa por la presencia de un mecanismo enzimático efectivo, como es la producción de betalactamasas, uno de los mecanismos de complementación de la impermeabilidad de la membrana externa que mejor se ha estudiado.

El que un antibiótico llegue con éxito a la diana, se calcula mediante el índice de acceso a la diana (target access index) TAI. Este índice refleja el balance entre la barrera de la permeabilidad y la producción de betalactamasas, es proporcional al coeficiente de permeabilidad de la droga, e inversamente proporcional al porcentaje de inactivación del antibiótico en el periplasma. A su vez se relaciona con la CMI de esta manera:

$$CMI = C_{inh} (TAI^{-1} + 1),$$

donde C_{inh} es una constante de cada antimicrobiano para cualquier especie, que indica la concentración de droga necesaria para inhibir la diana.

No se pueden obtener conclusiones respecto a que la disminución de OMPs sea la causa de una elevación en la CMI, sólo por constatar que los mutantes deficientes de porinas elevan este valor, ya que puede ocurrir que tales mutantes no suban la CMI hasta el punto en el que sea detectado, para ello habría que analizar los datos de forma cuantitativa utilizando el TAI (Nikaido, 1989).

Las betalactamasas hidrolizan al betalactámico que llega al periplasma impidiendo que alcance concentraciones suficientes para inhibir de forma efectiva las PBP. Este mecanismo explica que con frecuencia, las cepas deficientes en porinas sean más resistentes a los betalactámicos que a otros grupos de antimicrobianos.

La resistencia de *E. cloacae* y *P. aeruginosa* a carbapenémicos o el incremento de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *K. pneumoniae* productor de betalactamasas de espectro ampliado con frecuencia se debe a este doble mecanismo (Trías, 1990; Lee, 1991).

En el caso de *Acinetobacter*, Joly-Guillou (1988) intentó explicar la multirresistencia en cepas betalactamasa (negativa), como una alteración de las OMP. Al mismo tiempo, la actividad betalactamasa que presentaba la mayoría de las cepas estudiadas no era suficiente para explicar el alto grado de resistencia a betalactámicos de amplio espectro, por lo que consideraron que este último mecanismo podría ser el principal factor que contribuye a la resistencia a betalactámicos. Este mismo autor consideró que la resistencia intrínseca de *Acinetobacter* spp. a los betalactámicos se podría interpretar como una asociación entre la producción de betalactamasas constitutivamente y una disminución de la permeabilidad de la membrana externa.

1.7.2.5 . Resistencia a carbapenémicos debido a alteraciones de las OMPs.

Este mecanismo de resistencia tiene especial interés para el caso de los carbapenémicos. La resistencia a imipenem se ha asociado en muchas ocasiones a la disminución o ausencia de OMPs para el caso de numerosas bacterias, como *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Proteus* (Livermore 1992; 1993; Raimondi 1991). La OMP específica asociada con esta resistencia se piensa que funciona como porina para imipenem. En *P. aeruginosa* se ha estudiado el papel de OprD2, una proteína específica de 46 a 48 kD, que permite el paso de aminoácidos dibásicos y de imipenem, pero no de otros betalactámicos. Su pérdida se relaciona con la resistencia a este antibiótico.

En algunos casos aislados la resistencia de *Acinetobacter* se debe a la asociación de alteraciones de la permeabilidad y alteración de la diana del antimicrobiano. Dib y col. (1994) muestran un caso de resistencia a imipenem en un aislamiento de *Acinetobacter*, debido a la disminución de una OMP de 46 kD, asociada a la disminución de la expresión de 2 PBPs de 80 y 90 kD, las cuales tienen gran afinidad por este antimicrobiano. Al mismo tiempo esta cepa presentó actividad cefalosporinasa, por lo que consideró, en este caso, que los tres mecanismos pueden estar implicados en la resistencia a imipenem.

De nuevo Clark en 1996, demostró la resistencia a imipenem debido a una alteración de la permeabilidad de la membrana externa. Estudió el mecanismo de resistencia a imipenem en dos cepas de *Acinetobacter baumannii*, un aislamiento clínico resistente a imipenem junto a su cepa isogénica, que de manera espontánea había revertido a sensible. Observó que ninguna de las betalactamasas presentes en estos aislamientos hidrolizaban imipenem. Sin embargo, mediante el estudio por SDS-PAGE de las OMPs de ambas cepas, observó una marcada disminución de una proteína de 33-36 kDa en la cepa resistente a imipenem, a diferencia de la cepa isogénica sensible. Por ello consideró que la resistencia a imipenem en *Acinetobacter baumannii* está asociada a la expresión disminuida de OMPs de 33-36 kDa.

No en todos los casos se ha asociado la resistencia a imipenem a la disminución de OMPs. Gerhlein (1991), estudiando aislamientos de *Acinetobacter* sensibles a imipenem observó que los perfiles de OMPs de estas cepas y de sus correspondientes mutantes resistentes eran idénticas.

Más recientemente, Costa y col. caracterizaron (1996) una carbapenemasa hallada en varios aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem, obtenidos de pacientes tratados previamente con dicho antibiótico. Sin embargo observaron que el perfil de OMPs era idéntico, tanto en los aislamientos sensibles como en los resistentes.

1.7.3. Alteración de las proteínas fijadoras de penicilina.

La modificación de las PBPs es causa de resistencia en numerosos microorganismos. En *Acinetobacter* spp. la modificación de la diana puede contribuir a la resistencia a betalactámicos pero su grado de importancia no está aún definido, ya que existen otros mecanismos de resistencia asociados (betalactamasas y alteraciones de las OMP).

Obara y Nakae (1991) estudiaron el perfil de PBPs de cepas mutantes resistentes seleccionados de una cepa de *A. calcoaceticus*, mediante un ensayo de competición con bencilpenicilina marcada con C^{14} , y observaron que el patrón era diferente al de otros gramnegativos, incluidos *E. coli* y *P. aeruginosa*, siendo más similar al género *Bacteroides*. Se observaron cambios en la expresión de las PBPs asociados a la alterada afinidad por los betalactámicos en estas cepas, por lo que se dedujo que el mecanismo de resistencia a betalactámicos en estos aislamientos se debía a las alteraciones en las PBP, probablemente asociado a otros mecanismos, como la alteración de la permeabilidad celular.

Posteriormente, Gehrlein (1991), al comparar el perfil de OMPs en un aislamiento de *Acinetobacter baumannii* y su mutante resistente a imipenem, comprueba que no existen diferencias en dicho perfil, así como tampoco existen diferencias en la producción de betalactamasas, sin embargo sí demuestra un patrón diferente de PBP. En la cepa originaria se observaron 7 PBPs de diferentes pesos moleculares entre 24 y 94 kD, por los que imipenem tiene afinidad. Sin embargo en la cepa mutante resistente a imipenem no se observaron estas PBP, únicamente la de 24 kD, que predominaba en grandes cantidades. Parece ser que por posibles mutaciones se había producido una disminución de la síntesis de las PBPs con una sobre-expresión de la de 24 kD, que predominaba en la cepa resistente a imipenem. Dicha PBP no se saturaba con imipenem, ni siquiera a concentraciones elevadas, por lo que se dedujo que existía una baja afinidad del compuesto por esta proteína diana. Esta PBP podría ser un producto de degradación de otras, o bien podría ocurrir que, debido a la mutación, se afectara al control genético, dando lugar a una mayor expresión del gen estructural de 24 kD.

1.7.4. Mecanismos de “eflujo” (bombas de expulsión activa).

La membrana externa es también un elemento clave en la eliminación de los antimicrobianos mediante el proceso de “eflujo”. Este mecanismo depende de proteínas transportadoras citoplasmáticas, capaces de eliminar una gran variedad de compuestos de estructura químicamente diferente. Recientemente se ha propuesto la existencia de proteínas accesorias que actuarían como puentes entre los transportadores y las porinas de la membrana externa, facilitando de esta manera la expulsión directa del antimicrobiano desde el interior de la bacteria hasta el medio externo. Ya que la acumulación de un antibiótico es el resultado del “influjó” y “eflujo”, es comprensible que la combinación entre una reducida permeabilidad y un elevado “eflujo” de los antibióticos dé lugar a la resistencia antimicrobiana.

Este fenómeno se ha observado en algunas bacterias como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenzae*, etc (Nikaido, 1994; Levy, 1992). En *P. aeruginosa* se ha descrito un operón que codifica una proteína accesoria “MexA” y una nueva proteína de membrana externa: OprK (Poole, 1993). La inactivación de una u otra determinaría la hipersensibilidad del microorganismo a muchos antimicrobianos. La base genética de la resistencia por más de un mecanismo puede deberse a mutaciones pleiotrópicas que afectan a la sobreexpresión del mecanismo de “eflujo” y a la disminución de la expresión de porinas (Cohen, 1988; Mizuno, 1984). Este es el caso de los mutantes “Mar” (Multiply Antibiotic Resistance) de *E. coli* que son resistentes a una gran variedad de antibióticos debido a un mecanismo de “eflujo”. Parece ser que la presencia de un sistema de expulsión activa “AcrAB” es la causa de la resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, ampicilina, ácido nalidíxico y rifampicina (Ma, 1995; Okusu, 1996).

En *Acinetobacter* se ha estudiado poco este mecanismo de resistencia. Se han realizado algunos estudios para intentar explicar la elevada resistencia que presentan algunas cepas a las fluorquinolonas, relacionándose una menor acumulación de estos antibióticos en la membrana celular con las alteraciones en la diana (Moreau, 1996).

1.8. MECANISMO DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS.

1.8.1. Enzimas inactivantes de aminoglucósidos.

La resistencia a aminoglucósidos aparece tanto en bacterias grampositivas, como en gramnegativas. Se produce a través de tres mecanismos: alteración de la diana (ribosoma), que es un mecanismo poco frecuente, modificación del aminoglucósido y por fallo en el transporte de la droga hacia el interior de la célula. La modificación del aminoglucósido es el mecanismo más importante. Este mecanismo de resistencia puede ser mediada por cromosomas, plásmidos, o transposones.

Los aminoglucósidos se pueden modificar por uno de los siguientes mecanismos enzimáticos:

N-acetilación (AAC), O-fosforilación (APH), adenilación (ANT).

De todos ellos, el APH es el enzima más frecuente en las células procariotas.

Los enzimas modificantes de aminoglucósidos tienen un amplio perfil de sustrato. Puede existir resistencia cruzada entre ellos. El que un antibiótico sea sustrato de un enzima no significa que la cepa que lo contenga sea resistente a este antibiotico. El porcentaje de modificación del aminoglucósido puede influir en la resistencia clínica observada.

En *Acinetobacter* spp. hemos observado a lo largo de los años, un incremento de las resistencia a los aminoglucósidos. Desde 1983, Goldstein demostró la resistencia a este grupo de antibióticos mediada por los enzimas APH(3'5'')I y AAD(3), que van incluidos en el mismo

plásmido de resistencia, que además codifica la expresión de TEM-1. En estos microorganismos se han descrito los tres tipos de enzimas modificantes, pero se han encontrado variaciones geográficas en la incidencia de algunos genes particulares (Tabla 1.5). Por ejemplo, AAC(3)-Ia, se ha encontrado más frecuentemente en cepas de *Acinetobacter* spp. aisladas en Bélgica, que en las de Estados Unidos, y sin embargo no se han aislado en ningún caso en Argentina (Shaw, 1991; Shaw, 1993). Incluso existen cepas que poseen más de un gen de resistencia; se han encontrado hasta seis genes diferentes en algunos aislamientos.

Tabla 1.5.

Enzimas inactivantes de aminoglucósidos en *Acinetobacter* spp.

Acetilación	Adenilación	Fosforilación
AAC(6')	ANT(3')I	APH(3')I
AAC(2')I	AAD(3'')(9)	APH(3')II
AAC(3)I	ANT(2')I	APH(3')III
AAC(3)II	AAD(2')	APH(3')VI
AAC(3)V		APH(3'')I
AAC(3)IV		

En 1993, Vila y col. definieron 8 fenotipos de resistencia a aminoglucósidos, en función de la resistencia a los siguientes antibióticos: tobramicina, gentamicina, ampicilina y netilmicina. Observaron el predominio del fenotipo sensible a todos los aminoglucósidos (33%), un 19% de ellos correspondió a aquellos sensibles únicamente a ampicilina y al 20% correspondieron aquellos únicamente sensibles a netilmicina. Estos resultados, sin embargo contrastaron con los de Muller-Seryes (1989), que mostraron el fenotipo más frecuente, como aquel en el que todos

los aminoglucósidos eran resistentes. Vila (1993), al mismo tiempo, observó que el enzima que afecta a amicacina, el APH(3')-VI se encontraba con mayor frecuencia (28%) entre los aislamientos estudiados, seguido del AAD(3) en 15%, que afecta a estreptomicina y espectinomicina, y solamente el 4% de las cepas presentaban conjuntamente ambos enzimas.

La resistencia a amicacina es un hecho muy relevante en *Acinetobacter*. Se debe principalmente a la presencia de APH(3')VI, muy distribuido en *Acinetobacter* pero poco frecuente en las enterobacterias y en *Pseudomonas*, así como al enzima AAC(6')-I. Algunos genes que codifican este último enzima, *Ib* e *If*, se han encontrado exclusivamente en *Acinetobacter* (Lambert, 1994). Otros como el *Ig* es exclusivo de *A. haemolyticus*, tanto que puede facilitar la identificación de esta especie, de igual modo ocurre con el gen *Ij*, que permite identificar la especie *Acinetobacter* 13 (Lambert, 1993; Lambert, 1994).

La disminución de la permeabilidad mediada por la disminución de las proteínas de membrana externa puede afectar a la resistencia a los aminoglucósidos, al igual que a los betalactámicos. Este mecanismo se ha descrito en *Pseudomonas* spp., enterobacterias, y también en *Acinetobacter* spp. De esta manera, algunos autores explican cómo existen cepas resistentes a aminoglucósidos no productores de enzimas modificantes (Vila, 1993).

1.9. RESISTENCIA A FLUORQUINOLONAS

Aunque el mecanismo preciso es desconocido, está claro que, al igual que en otros gramnegativos, el mecanismo de resistencia a fluorquinolonas está mediado por alteraciones en la DNA girasa, debido a mutaciones del gen *gyrA*, que codifica la topoisomerasa II, o del *parC*, que codifica la topoisomerasa IV, no habiéndose encontrado alteraciones en el gen *gyrB*.

Vila y col. (1995) determinaron la resistencia a fluorquinolonas en 21 aislamientos clínicos de *Acinetobacter*, sin relación epidemiológica entre sí. Se observó que, en 15 de ellos, que presentaban una CMI a ciprofloxacino mayor o igual a 4 mg/l, había una mutación del gen *gyrA*, concretamente se había producido un cambio de Ser-83 por Leu. En 6 cepas con CMI igual a 1 mg/l, no se había observado tal mutación, aunque en una de estas cepas, se observaba un cambio de Gly-81 por Val. A pesar de que haya más genes que puedan contribuir a la resistencia a fluorquinolonas, las mutaciones en Ser-83 dentro del gen *gyrA*, están más claramente implicadas en la resistencia a fluorquinolonas en *Acinetobacter* (Vila, 1995).

Parece ser que en *Acinetobacter*, la resistencia a este grupo de antimicrobianos viene dada en primer lugar por las alteraciones en el gen *gyrA*, al igual que en *E. coli*. Por otro lado, se ha observado que las mutaciones en el gen *parC* por cambios de Ser-80 por Leu constituyen el segundo mecanismo de resistencia. La complementación entre ambas alteraciones genéticas, es la causa principal de la elevada resistencia que *Acinetobacter* presenta hacia las fluorquinolonas, y podría explicar porqué algunos aislamientos con la misma mutación en el gen *gyrA* poseen diferentes CMIs a ciprofloxacino (Vila, 1997).

Por último, no hay que olvidar que otros mecanismos de resistencia, como son las alteraciones en la permeabilidad, o la presencia de bombas de expulsión, pueden condicionar la

actividad de las quinolonas, de este modo se puede explicar cómo algunos aislamientos de *Acinetobacter* presentan resistencia combinada a los tres principales grupos de antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos y fluorquinolonas) (Moreau, 1996).

1.10. RESISTENCIA A OTROS ANTIBIÓTICOS.

Existen pocos estudios sobre los mecanismos de resistencia a otros antibióticos en *Acinetobacter*. Algunos casos de alto nivel de resistencia a trimetropin con CMI's superiores a 1000 mg/l, se han relacionado con la presencia de genes de resistencia incluidos en transposones, que a su vez van incluidos en plásmidos conjugativos de gran tamaño (Chirnside, 1985; Muller-Serieys, 1989). Asimismo se ha encontrado el gen cloranfenicol acetiltransferasa I (CATI) en un aislamiento clínico de *Acinetobacter* resistente a cloranfenicol, sugiriendo su localización en un transposón, incluido tanto en el cromosoma como en el plásmido de dicho microorganismo (Goldstein, 1983).

2. OBJETIVOS.

- 1.- Estudiar los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. obtenidos en el Hospital de la Princesa durante un período de 3 años y determinar la actividad *in vitro* de 24 antimicrobianos a dichos aislamientos. Analizar la evolución de la sensibilidad antimicrobiana de acuerdo con el año y procedencia del microorganismo.
- 2.- Comparar los mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en los aislamientos de *Acinetobacter* relacionados genéticamente y en cepas no relacionadas estableciendo patrones mediante la aplicación de métodos de tipado, dentro del ambiente hospitalario y ambulatorio.
- 3.- Detectar la presencia de betalactamasas como mecanismo de resistencia a betalactámicos y estudiar su distribución en aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. Caracterizar las betalactamasas encontradas mediante la aplicación de estudios bioquímicos: determinación del punto isoelectrico, perfil inhibitorio y perfil de hidrólisis a varios betalactámicos.
- 4.- Comparar el patrón fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos y su relación con la producción de betalactamasas en los diferentes grupos de aislamientos establecidos, con el fin de determinar su papel en la resistencia a betalactámicos.

- 5.- Estudiar el perfil de proteínas de membrana externa con la finalidad de detectar posibles alteraciones en la permeabilidad que conduzcan a la resistencia a betalactámicos. Comparar los resultados de dicho estudio en las cepas genéticamente relacionadas y con diferentes patrones de resistencia, con las cepas no relacionadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. MICROORGANISMOS.

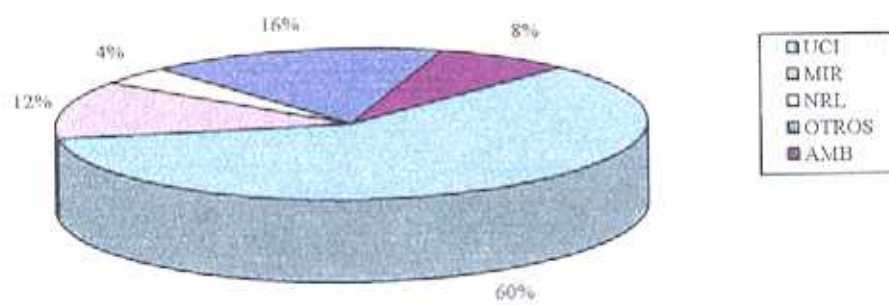
3.1.1. Procedencia de los microorganismos.

Se ha estudiado un total de 156 cepas aisladas a partir del cultivo de diferentes muestras clínicas, remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa. Se han incluido todos los aislamientos obtenidos durante los años 1995, 1996 y 1997. Cada muestra corresponde a un paciente, ya sea ingresado en alguno de los servicios del hospital, o procedente de ambulatorio. En la figura 3.1 se muestra la distribución de los aislamientos según los diferentes Servicios del hospital, así como aquellas de origen ambulatorio.

Las muestras se recogieron con material estéril siguiendo las normas de recogida de muestras para cultivos en microbiología (Isenberg, 1992). En el laboratorio se sembraron en placas de agar Columbia con un 5% de sangre de carnero (agar sangre) y agar chocolate, así como en medio líquido (tioglicolato o frascos de hemocultivo, según el tipo de muestra). Las placas y los medios líquidos se reincubaron en aerobiosis, así como en atmósfera hipercápnica. Se realizó el aislamiento de las colonias crecidas subcultivando en agar sangre o agar chocolate. La procedencia de los microorganismos aislados queda reflejada en la tabla 3.1.

En algunas técnicas más específicas, debido a su complejidad, no se ha estudiado el total de las cepas, sino que se ha seleccionado un grupo de aislamientos atendiendo a los criterios que quedan recogidos en sus correspondientes apartados.

Figura 3.1.
Distribución de los aislamientos según los distintos Servicios.



UCI: Unidades de Cuidados Intensivos; MIR: Medicina Interna; NRL: neurología; AMB: ambulatorio.

Tabla 3.1.

Origen de los microorganismos aislados.

Origen de las muestras	Nº de aislamientos
BAS	58
ESPUTO	10
ORINA	26
SANGRE	16
PUNTA DE CATÉTER	16
ABSCESO	4
Ex. HERIDA	16
LCR	1
L. ASCÍTICO	1
PULMÓN	1
Ex. NASAL	1
VERRUGAS	1
LESIÓN CUTÁNEA	5
TOTAL	156

BAS: broncoaspirado; Ex. HERIDA: exudado de herida quirúrgica; Ex. NASAL: exudado nasal; LCR: líquido cefalorraquídeo; L. ASCÍTICO: líquido ascítico.

3.1.2. Cepas control.

- En todas las pruebas de identificación, tipado fenotípico y genotípico se utilizó la cepa control *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.
- Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se utilizaron las siguientes cepas control:

- *Escherichia coli* ATCC 25922.

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

- Para el estudio de betalactamasas se han incluido las siguientes cepas como control:

- *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

- *E. coli* portadora de plásmidos que codifican betalactamasas de pI conocido.

- *Serratia marcescens* de la colección del Laboratorio de Microbiología.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3.1.3. Conservación de cepas.

Los microorganismos se congelaron por duplicado en tubos de 1,5 ml con 1 ml de glicerol (caldo tripticasa de soja y 15-20% de glicerina, en agua estéril), a una temperatura de -20°C. Para su estudio se descongelaron las cepas y se inocularon 20 µl en placas de agar Columbia con un 5% de sangre de carnero, reincubando posteriormente las placas en una estufa a 35°C, durante 24 horas.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS. MÉTODOS FENOTÍPICOS.

La identificación preliminar se realizó mediante el aspecto mucoso y blanquecino de la colonia, el crecimiento en los medios habituales, morfología de coco-bacilo gramnegativo en la tinción de Gram y por el resultado negativo de la prueba de la citocromo oxidasa.

3.2.1. Sistema Microscan.

Se utilizó el sistema automatizado *MicroScan Walkaway* (Baxter, Dade) para la identificación de *Acinetobacter* spp. a nivel de género. Este sistema agrupa las especies de *Acinetobacter* en *Acinetobacter lwoffii* y el resto como *Acinetobacter anitratus/haemolyticus*. Las cepas identificadas como pertenecientes a este último grupo fueron las seleccionadas para la realización de este estudio. Se empleó la metodología según las instrucciones del fabricante.

3.2.2. Sistema API 20 NE.

Se utilizó el sistema API 20 NE (bio-Mérieux, Macy l'Etoile, Francia) para la identificación a nivel de género, e identificación presuntiva a nivel de especie. Este sistema consiste en unas galerías de plástico compuestas por 20 pocillos que contienen sustratos de forma deshidratada para llevar a cabo 8 pruebas bioquímicas convencionales (reducción de nitratos a nitritos y a grupo azo, formación de indol, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis de la esculina, hidrólisis de la gelatina, β -galactosidasa), reacción de fermentación de la glucosa,

y 12 pruebas de asimilación de fuentes de carbono. Tras el crecimiento de los microorganismos en agar sangre, se preparó una suspensión de

2 ml de solución salina estéril y se ajustó a una turbidez igual al patrón 0,5 de McFarland. De esta suspensión, se llenaron los tubos (y no las cúpulas) de los 8 primeros pocillos con una pipeta estéril. Se añadieron al medio "AUX Medium" incluido en el sistema cuatro a ocho gotas de la suspensión bacteriana y se llenaron los tubos y cúpulas de los pocillos de asimilación, de modo que el nivel de líquido quedara horizontal o ligeramente convexo.

A las 24 horas de incubación a 35° C, se anotaron las reacciones espontáneas y se leyeron las restantes pruebas bioquímicas tras el revelado con sus reactivos correspondientes. A las 48 horas se anotaron los resultados positivos y negativos (producción y ausencia de turbidez respectivamente) de las pruebas de asimilación.

Se obtuvo un perfil numérico de 7 dígitos para cada microorganismo que, introducido en un programa informático (APILAB Plus, versión 3. 3.2., 1990) proporcionó la identificación del microorganismo. En la tabla 3.2 se refleja el porcentaje de reacciones positivas que mediante el sistema API 20 NE, permite diferenciar las especies de *Acinetobacter*.

3.2.3. Hemólisis y Temperatura de crecimiento.

Mediante la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas (30°, 37°, 41°, y/o 44° C), y por la ausencia o producción de hemólisis en agar sangre de carnero, se confirmó la identificación de los microorganismos a nivel de especie.

Para el crecimiento a diferentes temperaturas se emplearon medios sólidos de agar sangre, y los resultados discrepantes se confirmaron con el crecimiento en un medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI). Esta prueba se determinó tras la incubación durante 18 horas. La hemólisis se estudió en agar Columbia con 5% de sangre de carnero, y las placas se incubaron a 35° C, durante 48 horas.

Tabla 3.2.

Porcentaje de reacciones positivas en el sistema API 20 NE en *Acinetobacter*spp.

API 20 NE	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU _a	ARA _a	MNE _a	MAN _a	NAG _a	MAL _a	GNT _a	CAP _a	ADH _a	MLT _a	CIT _a	PAC _a	OX
<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	1	0	20	0	2	0	1	0	52	79	1	0	0	0	30	99	90	100	99	98	0
<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	2	0	24	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	98	2	98	78	1	0
<i>Acinetobacter</i> <i>mitis/Johnstonii</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	26	2	1	0	0	0	0	88	26	98	76	0	0
<i>Acinetobacter</i> <i>woffii</i>	4	0	1	0	3	0	0	1	8	4	1	1	1	0	1	70	26	46	0	36	0

3.3. ESTUDIOS DE TIPADO.

3.3.1. Biotipado por Sistema API 20 NE.

La metodología empleada para este sistema de biotipado queda descrita en el apartado de identificación. Se definieron diversos tipos según las distintas combinaciones de los 7 dígitos que constituían el código que facilitaba el sistema. La diferencia en un dígito se consideró suficiente para designar diferentes biotipos.

3.3.2. Biotipado de Bouvet y Grimont.

Este método, propuesto por Bouvet y Grimont, consiste en observar la asimilación de diferentes sustratos por parte de los aislamientos clasificándolos según su capacidad de crecimiento (positiva o negativa) para todos y cada uno de los sustratos empleados. Los sustratos (levulinato, citraconato, L-fenilalanina, 4-hidroxibenzoato y L-tartrato) fueron disueltos y filtrados, añadiéndose a una concentración al 0,1% en medio Cruze esterilizado en autoclave (medio mínimo, con la siguiente composición por litro: 10 g de K_2HPO_4 , 5 g de NaH_2PO_4 , 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,001 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$). Cada aislamiento se inoculó, a partir de un cultivo puro en medio sólido, en 5 ml de BHI y se incubó durante 18 horas. Se inoculó un volumen de 10 μ l de BHI en cada medio y se incubaron durante 6 días a 30°C, observándose posteriormente la producción de turbidez, según la cual se identificó cada reacción como positiva (líquido turbio) o negativa (líquido transparente). Los aislamientos se clasificaron en diferentes biotipos según los propuestos por Bouvet y Grimont (1987), Bouvet y col. (1990) y Gerner-Smidt (1993). En la tabla 3.3 se reflejan estos datos.

Tabla 3.3.

Biotipos definidos por Bouvet y Grimont (1987), Bouvet (1990) y Gerner-Smidt (1993).

Sustratos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
levulinato	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
citraconato	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L-Phe	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
pOHbenzoato	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
L-tartrato	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+

L-Phe: L-fenilalanina; pOHbenzoato: para-hidroxibenzoato.

3.3.3. PCR de elementos repetitivos (rep-PCR).

Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores se basaban en secuencias de elementos de ADN repetidos, altamente conservados, rep (repetitivas, extragénicas, palindrómicas). Las secuencias de los iniciadores fueron las siguientes: rep1 5'-IIIIGCGCCGICATCAGGC-3' y rep2 5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3'. Media colonia crecida en agar MacConkey se resuspendió en 25 µl de agua y se hirvió durante 10 min.. Se centrifugó durante 5 min. a 13000 rpm y se añadió 25 µl de la mezcla de reacción, con la siguiente composición: Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), KCl 100 mM, MgCl₂ 3,0 mM, gelatina 0,1%, dNTP 400 µM y los iniciadores rep1 y rep2 a una concentración de 1 µM cada uno. Se añadió 2,5 de Taq polimerasa y se procedió a la amplificación. Las condiciones del termociclador fueron 30 ciclos de la secuencia: desnaturalización a 94°C, 1 minuto; acoplamiento a 40°C, 1 minuto; extensión a 65°C, 8 minutos. Tras los 30 ciclos se desarrolló una extensión final de 65°C durante 16 minutos. Los productos amplificados fueron comparados por electroforesis en agarosa al 2% en TAE 1X con bromuro de etidio 0,5 mg/L a 60 V durante 2 horas.

- *Análisis de los perfiles obtenidos.* Se compararon visualmente, designando cada patrón de bandas con una letra. Se definió cada tipo cuando todas las bandas visibles de cada aislamiento tenían la misma distancia de migración. No se consideró una diferencia cuando existía heterogenicidad con respecto a la intensidad y forma de las bandas. Se consideró diferente tipo cuando existía diferencia en distancia de migración de más de 2 bandas. La diferencia de intensidad de 2 o menos bandas o la ausencia de las mismas condujo a considerar los subtipos, designados con un número, pertenecientes a un mismo tipo.

3.3.4. Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs).

El perfil de proteínas de membrana externa se determinó mediante una electroforesis con geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se siguió el protocolo de Martínez-Martínez y col. que queda descrito en el apartado 3.5.1 de Material y Métodos.

Para este estudio se seleccionaron cepas con diferente patrón de genotipado, que a su vez presentaban diferente perfil de resistencia a betalactámicos.

- *Análisis de los perfiles obtenidos.* Se compararon visualmente, designando cada patrón de bandas con un número. Se definió cada tipo cuando cada aislamiento tenía el mismo número de proteínas principales (bandas de mayor intensidad), y cuando éstas tenían el mismo peso molecular aparente. No se consideró una diferencia cuando existía heterogenicidad con respecto a las proteínas minoritarias o de menor intensidad.

3.4. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro*.

Se determinó la actividad *in vitro* a los siguientes 15 antibióticos betalactámicos:

ampicilina (AMP), piperacilina (PIP), ticarcilina (TIC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepima (CEF), imipenem (IMP), meropenem (MEP), ácido clavulánico (CLAV), sulbactam (SULB), tazobactam (TAZ), amoxicilina-clavulánico (AMC), ampicilina-sulbactam (AS), ticarcilina-clavulánico (TICCL) y piperacilina-tazobactam (TZP).

Se estudió la actividad *in vitro* de otros 9 antibióticos no betalactámicos:

amicacina (AK), gentamicina (GN), tobramicina (TO), ofloxacino (OFL), doxiciclina (DOX), fosfomicina (FO), colistina (CT), rifampicina (RD), azitromicina (AZIT).

Todos los antibióticos se encontraban en forma de sustancia pura valorada. Se pesaron según la potencia descrita por el fabricante, y se disolvieron en las condiciones apropiadas (Tablas 3.4 y 3.5).

Tabla 3.4.

Solventes y diluyentes de los antibióticos betalactámicos estudiados.

ANTIBIÓTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
Ampicilina	Tampón fosfato pH 8,0, 0,1 mol/L	Agua
Piperacilina	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Ticarcilina	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Cefotaxima	Agua	Agua
Ceftazidima	Carbonato sódico (10%)	Agua
Cefepima	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Imipenem	Tampón fosfato pH 7,2, 0,01 mol/l	Agua
Meropenem	Tampón fosfato pH 7,2, 0,01 mol/l	Agua
Ácido clavulánico	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Sulbactam	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Tazobactam	Agua	Agua
Amoxicilina-clavulánico	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Ampicilina-sulbactam	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Piperacilina-tazobactam	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua
Ticarcilina-clavulánico	Tampón fosfato pH 6,0, 0,1 mol/L	Agua

Tabla 3.5.

Solventes y diluyentes de los antibióticos no betalactámicos estudiados.

ANTIBIÓTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
Amicacina	Agua	Agua
Gentamicina	Agua	Agua
Tobramicina	Agua	Agua
Ofloxacino	½ volumen agua, más 1 gota de NaOH 0,1 mol/L hasta disolución	Agua
Colistina	Agua	Agua
Rifampicina	Metanol	Agua
Doxiciclina	Agua	Agua
Fosfomicina	Agua	Agua
Azitromicina	Etanol al 95%	Agua

3.4.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. Método de dilución en agar.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó por el método de dilución en agar según las normas del NCCLS (NCCLS, 1998).

Se probaron 15 concentraciones, de 0,008 a 128 mg/l, obtenidas por diluciones dobles seriadas, para todos los antibióticos estudiados, excepto para ticarcilina, ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina y piperacilina-tazobactam que fueron de 0,064 a 1024 mg/l. Ampicilina-sulbactam y amoxicilina-clavulánico se probaron a una proporción 2:1, mientras que tazobactam se añadió a piperacilina a una concentración fija de 4 mg/l. Ticarcilina-clavulánico se estudió añadiendo el inhibidor a una concentración fija de 2 mg/l. Las diferentes diluciones se añadieron a placas de Petri estériles que contenían agar Mueller-Hinton autoclavado y a 50°C. Tras su solidificación se conservaron a 4°C durante 24 horas.

A partir de un cultivo puro obtenido en agar sangre a 35°C durante 18 horas se inocularon 4-5 colonias en 5 ml de caldo BHI, que se incubó durante 18 horas a 35°C. Se preparó un inóculo con una densidad óptica equivalente a 0,5 de McFarland (contenido aproximado de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml), que se diluyó en agua destilada hasta conseguir una concentración de 10^7 UFC/ml. La inoculación de las placas se realizó con un replicador de Steer, que dispensa gotas de unos 2 µl/gota, de modo que se conseguía un inóculo final en el agar de 10^4 UFC/gota. Las placas se incubaron durante 18 horas a 35°C.

La CMI correspondió a la concentración más baja de antimicrobiano que inhibía el crecimiento bacteriano visible.

3.4.2. Puntos de corte de resistencia.

Los puntos de corte utilizados en la interpretación de las diferentes categorías de sensibilidad fueron los recomendados por el NCCLS para su aplicación a microorganismos no fermentadores y no pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* (NCCLS, 1998). Para fosfomicina se consideró el punto de corte de resistencia en >64 mg/l (Andrews, 1983). Para ampicilina y amoxicilina-clavulánico se consideró el punto de corte recomendado por el NCCLS para enterobacterias (NCCLS, 1998). Para el caso de colistina se consideró el punto de corte recomendado por el grupo MENSURA (Mesa Española para la Normalización de la Susceptibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos, 1992), para su aplicación a bacilos gramnegativos no fermentadores. En el caso de rifampicina y azitromicina se utilizó el criterio de las mismas normas, pero aplicadas a *Staphylococcus* spp.. No existe ninguna recomendación publicada de los puntos de corte para los siguientes antibióticos: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. El esquema de los puntos de corte considerados se encuentra en las tablas 3.6 y 3.7.

Tabla 3.6.

Criterios de sensibilidad para los antibióticos betalactámicos probados (CMI en mg/l).

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32
Piperacilina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ticarcilina	≤ 16	32-64	≥ 128
Cefotaxima	≤ 8	16-32	≥ 64
Ceftazidima	≤ 8	16	≥ 32
Cefepima	≤ 8	16	≥ 32
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Amoxicilina-clavulánico	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Ampicilina-sulbactam	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Piperacilina-tazobactam	$\leq 16/4$	32/4-64/4	$\geq 128/4$
Ticarcilina-clavulánico	$\leq 16/2$	32/2-64/4	$\geq 128/2$

Tabla 3.7.

Criterios de sensibilidad para los antibióticos no betalactámicos probados (CMI en mg/l).

ANTIBIÓTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16
Ofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Colistina	≤ 2	4	≥ 8
Rifampicina	≤ 1	2	≥ 4
Doxiciclina	≤ 4	8	≥ 16
Fosfomicina	≤ 64	-	> 64
Azitromicina	≤ 2	4	≥ 8

3.4.3. Perfiles de resistencia.

Se estableció el perfil de resistencia a betalactámicos siguiendo el estudio de Bergogne-Bérézin (1995). Se definieron cinco grupos según la resistencia a ticarcilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima e imipenem, que quedan reflejados en la tabla 3.8.

El fenotipo I incluía los aislamientos sensibles a los cinco betalactámicos, al fenotipo II pertenecían las cepas resistentes a ticarcilina, piperacilina, y sensibles a cefotaxima, ceftazidima e imipenem. El fenotipo III englobó a aquellos aislamientos sensibles a ticarcilina e imipenem, resistentes a cefotaxima, y con actividad variable frente a piperacilina y ceftazidima. El fenotipo IV agrupaba a los aislamientos solamente sensibles a imipenem y con actividad variable a ceftazidima, y el fenotipo V incluía a las cepas resistentes a todos los betalactámicos incluido imipenem. Los grupos III y IV se dividieron en 2 subgrupos a y b, según la sensibilidad o resistencia a ceftazidima respectivamente (Joly-Guillou, 1995).

Con el fin de estudiar posteriormente la correlación entre el antibiograma y la producción de betalactamasas se establecieron los patrones de resistencia a betalactámicos atendiendo a 2 criterios de puntos de corte; el criterio del NCCLS de 1998 establecido para *Acinetobacter*, al que llamamos criterio A, y el llamado criterio B que se basaba en los puntos de corte del NCCLS de 1997 para microorganismos no fermentadores.

Se consideró que un aislamiento era resistente cuando presentaba valores de CMI resistente o intermedia en cualquier criterio aplicado. La CMI se determinó por el método de dilución en agar. En la tabla 3.9 se exponen los diferentes puntos de corte establecidos según los criterios A (NCCLS, 1998) y B (NCCLS, 1997).

Tabla 3.8.

Fenotipos de resistencia a betalactámicos.

Grupo I	TIC ^S PIP ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S
Grupo II	TIC ^R PIP ^R CTX ^S CAZ ^S IMP ^S
Grupo III	TIC ^S PIP ^V CTX ^R CAZ ^V IMP ^S
Grupo IV	TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^V IMP ^S
Grupo V	TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^R IMP ^R

Tabla 3.9.

Puntos de corte según los diferentes criterios A y B.

Criterio/ATB	TIC			PIP			CTX			CAZ			IMP		
A (NCCLS 1998)	≤8	16	≥32	≤16	32-64	≥128	≤8	16-32	≥64	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16
B (NCCLS, 1997)	≤64	-	≥128	≤64	-	≥128	≤8	16-32	≥64	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R

3.5. ESTUDIO DE LAS BETALACTAMASAS EN *Acinetobacter*.

3.5.1. Ensayo de la actividad betalactamasa.

El ensayo se realizó en extractos enzimáticos del total de las 156 cepas.

3.5.1.1. Extracción de las Betalactamasas.

El extracto enzimático se obtuvo siguiendo el protocolo de Joly-Guillou y col. (1988) con ligeras modificaciones. Se resuspendió el crecimiento bacteriano correspondiente a la extensión de media placa de agar Mueller-Hinton, incubada durante 18 horas a 30° C, en 1 ml de tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 6.9). Se centrifugó durante 15 min. a 13.500 rpm, las células se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se congelaron a -20° C. Tras su descongelación se sonicaron a potencia máxima durante cuatro a cinco ciclos de 1 min., con intervalos de 30 seg. entre cada ciclo. Los tubos se mantuvieron en un baño de hielo durante todo el proceso. Se centrifugaron durante 15 min. a 13500 rpm y se separó el sobrenadante, que se almacenó a -20° C.

3.5.1.2. Detección cualitativa de betalactamasas mediante el ensayo de la nitrocefina..

La actividad betalactamasa en el extracto enzimático se determinó mediante la hidrólisis de la nitrocefina, en una solución de 0,5 mg/ml. Para ello, se añadieron 30 µl de esta solución sobre 10 µl del extracto enzimático. El ensayo se consideró positivo cuando se produjo un cambio de color del amarillo original a rojo ladrillo, entre 2 y 5 minutos (O'Callaghan, 1972; Livermore, 1996).

3.5.2. Caracterización de las betalactamasas mediante isoelectroenfoque.

Este estudio se realizó en los 156 extractos enzimáticos obtenidos previamente por sonicación.

La determinación del punto isoeléctrico (pI) se realizó aplicando un método de isoelectroenfoque (Multiphor II Electrophoresis System, Pharmacia Biotech). Se utilizaron geles de poliacrilamida, con un amplio rango de anfólitos (pH 3,5 - 9,5). Como controles se utilizaron diferentes betalactamasas de pI conocido (TEM-1, SHV-1, PSE-2, OXA-2, OXA-3) y un marcador estándar preteñido. Se añadieron 10 µl de cada extracto enzimático sobre cada pocillo, aplicando un voltaje máximo de 1000 V, a una potencia constante de 15W. Al cabo de 1 hora y media se reveló el gel extendiendo sobre éste una solución de nitrocefina (0,5 mg/ml) (Livermore, 1996).

Para definir más claramente algunas bandas de pI se utilizaron en casos concretos, geles con un menor rango de anfólitos (pH 5,5-8,5).

3.5.3. Caracterización de las betalactamasas mediante el perfil inhibitorio.

Las betalactamasas se caracterizaron según su perfil de inhibición por diversas sustancias, antibióticas y no antibióticas. Para ello se aplicaron los siguientes métodos:

3.5.3.1. Determinación cualitativa por isoelectroenfoque.

La inhibición de las betalactamasas se estudió de manera cualitativa por la técnica de isoelectroenfoque descrita anteriormente, con modificaciones.

Se estudió la inhibición por ácido clavulánico (300 μ M), sulbactam (300 μ M), y cloxacilina (300 μ M) (Livermore, 1996). Como control de la técnica se empleó una betalactamasa de pI conocido (TEM-1).

Los extractos enzimáticos se añadieron por duplicado. Se cubrió la mitad del gel con la solución de la sustancia inhibidora, se dejó actuar durante unos minutos, de modo que tras el revelado con nitrocefina se observaba que existía inhibición, por la ausencia de bandas de pI en la zona del gel cubierto por dicha sustancia.

3.5.3.2. Ensayo de competición de la Nitrocefina.

Se siguió el protocolo de Papanicolaou y col. con ligeras modificaciones (Papanicolaou, 1990).

- Se estudió la inhibición por los siguientes betalactámicos, probados a una única concentración:

- Acido clavulánico (10 μ M), sulbactam (20 μ M), cloxacilina (4 mg/l), y aztreonam (1,148 μ M).

- Se estudió la inhibición por los siguientes inhibidores no betalactámicos:

- ClNa (140mM), EDTA (0,1 mM).

Los extractos enzimáticos se diluyeron hasta el punto en el que 50 μ l producían aproximadamente 0,2 de absorbancia (492 nm), al medirlos a los 2 minutos. Dichos extractos se añadieron a pocillos duplicados que contenían 50 μ l de cada inhibidor, y pocillos control que contenían 50 μ l de solución salina. La mezcla se incubó durante 30 min. a 37° C, excepto para el caso de ClNa y EDTA que se incubaron durante 10 min.. Posteriormente se añadió a cada pocillo 50 μ l de una solución de nitrocefina (0,5 mg/ml).

Se utilizaron en cada ensayo betalactamasas de referencia TEM-1 obtenidas de *E. coli* o de *H. influenzae* procedentes de la colección del cepario del Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa.

3.5.3.2.1. Determinación cualitativa.

Se consideró que existía inhibición cuando a los 2 min. no se visualizaba el cambio de color de la nitrocefina en los pocillos con inhibidor, comparándolo con el pocillo control.

3.5.3.2.2. Determinación cuantitativa.

Se determinó el % de inhibición de los extractos enzimáticos que contenían las betalactamasas. Se calculó de la siguiente manera:

$$\bullet 100 \times (1,00 - (A_{492} \text{ pocillo con inhibidor} / A_{492} \text{ pocillo control}))$$

La lectura de las absorbancias (A_{492}) se realizó a los 2, 5 y 10 min. y posteriormente, a intervalos de 10 min. hasta los 40 min. totales.

Cuando el máximo porcentaje de inhibición superaba el 25% se calculó la pendiente o tasa de disminución de la inhibición, para diferenciar aquellas enzimas con porcentajes similares cuya inhibición solamente variaba con el tiempo. Se calculó de la siguiente forma:

$$\bullet \text{Máximo \% de inhibición} - \% \text{ de inhibición a 10 min.} / 10$$

Para estudiar la reproducibilidad se probaron los controles repetidamente entre 2 a 8 veces en días diferentes. El resto de extractos se estudiaron por duplicado.

3.5.4. Perfil de hidrólisis.

Las betalactamasas se caracterizaron mediante la determinación del perfil de hidrólisis de varios betalactámicos, utilizando dos métodos:

3.5.4.1 Ensayo microbiológico.

Se siguió el protocolo de Paton y col. (1993). El estudio se realizó a partir de extractos enzimáticos. Como extractos control se utilizaron aquellos que contenían betalactamasas conocidas (OXA-2 y TEM-1). Los extractos se utilizaron crudos, diluidos a 1:2, 1:4 y a 1:8. Según el antibiótico a estudiar se utilizaron como cepas control de hidrólisis *S. aureus* ATCC 25923 o *E. coli* ATCC 25922.

Se estudió la hidrólisis de los siguientes 9 antibióticos betalactámicos:

- ampicilina, cefazolina (CFZ), oxacilina (OXA), carbenicilina (CARB), cefuroxima (CXM), cefotaxima, ceftazidima, imipenem y meropenem.

La cepa control se sembró en una placa de agar Mueller-Hinton y se colocó un disco del antibiótico a estudiar. En la zona periférica de sensibilidad de dicho antibiótico se colocaron discos de papel de filtro impregnados con 15 µl del extracto enzimático puro y diluido. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se observó hidrólisis del antibiótico cuando existía crecimiento de la cepa control dentro de la zona esperada de inhibición.

3.5.4.2. Ensayo espectrofotométrico. Determinación de la actividad enzimática específica.

Se determinó la actividad enzimática específica (V), expresada en μ moles de enzima que hidrolizan el antibiótico por cada minuto, al incubarlos a 30°C. Al referir esta fórmula a los mg de proteína se expresó en Unidades (U). Se estudió la hidrólisis de las betalactamasas respecto a la cefaloridina (LOR) o bencilpenicilina (PEN).

Se calculó según la siguiente fórmula:

$$V = (\Delta A/\text{min} \times \text{min}/\Delta A_{\text{total}}) \times N/\text{mg proteína}$$

donde, $\Delta A/\text{min}$ es el cambio de absorbancia producido por cada min.,

ΔA_{total} es el cambio de absorbancia producido hasta la hidrólisis total,

N es concentración molar del extracto enzimático.

El antibiótico que presentara mayor actividad hidrolítica se consideró como el 100%, de modo que se pudo calcular la actividad hidrolítica de otros antimicrobianos, expresando su actividad enzimática en porcentaje respecto al considerado el 100%.

Además de la hidrólisis de cefaloridina y bencilpenicilina se estudió la hidrólisis de los siguientes antibióticos:

- Cefotaxima, ceftazidima, imipenem, meropenem, carbenicilina y oxacilina.

Se empleó la concentración de 100 μ M para todos los antibióticos, excepto en algunos casos donde se utilizó cefaloridina 1mM, bencilpenicilina a 1000 μ M, y 60 μ M para imipenem.

Los extractos se estudiaron crudos, siempre que se tratara de cepas que presentaran una sola betalactamasa.

3.5.5. Estudio del caracter inducible/constitutivo de las betalactamasas cromosómicas.

Se estudió la producción de betalactamasas inducibles de clase I, en aquellas cepas betalactamasa (positiva) con perfil de resistencia de tipo I. Se utilizó un aislamiento de *Serratia marcescens* de la colección del Hospital de la Princesa, como cepa control de producción de betalactamasas inducibles. Se aplicaron dos métodos:

3.5.5.1. Prueba de sinergia de doble disco.

Se sembró un inóculo de 0,5 de MacFarland de la suspensión bacteriana en una placa de agar Mueller-Hinton. Se colocó un disco de cefotaxima (30 µg), y a una distancia de 1,5 a 2 cm se colocó un disco de cefoxitina (30 µg). Tras la incubación a 35°C durante 18 horas, se consideró que el aislamiento tenía una betalactamasa inducible, si el radio de inhibición alrededor de la cefotaxima se achataba en la zona más próxima al disco de cefoxitina (Sanders, 1979; Livermore, 1996).

3.5.5.2. Incorporación de inductor al agar.

Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton con y sin imipenem (0,06 mg/l). Se inocularon las placas (dos por cada cepa) con una suspensión del aislamiento, diluido hasta el punto de producir crecimiento semiconfluyente (0,5 MacFarland). Se aplicaron discos de cefotaxima (30 µg) a ambas placas y se incubaron a 35°C durante 18 horas. Se midieron los halos de inhibición del antibiótico. Se observaba inducción si existía una reducción del diámetro de inhibición mayor de 3 mm en las placas que contenían imipenem comparado con las placas que no contenían dicho antibiótico (BSAC Work Party, 1991).

3.5.6. Estudio de la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas.

Para poner en evidencia la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas se siguió el protocolo de Medeiros y col. (1985) con modificaciones (Roy, 1989; Roy, 1990). Se seleccionaron cepas con distintos niveles de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación que además eran betalactamasa (positiva). Esta técnica se basaba en controlar simultáneamente, para cada cepa, el tiempo de hidrólisis de la nitrocefina, en un cultivo de 18 horas en medio líquido (BHI), y del cultivo tratado previamente con aztreonam (1 μ M), o con ácido clavulánico (10 μ M).

Se midió el tiempo de hidrólisis, es decir el tiempo que tardaba en producirse el cambio de color amarillo a rojo ladrillo, considerándose positiva la hidrólisis detectada antes de los 60 seg.

Se consideraba que existía hiperproducción de betalactamasas cromosómicas, si se producía la hidrólisis en el pocillo de ácido clavulánico, generalmente en un tiempo inferior a 15 seg., pero si no se producía hidrólisis en el pocillo de aztreonam.

Si se producía hidrólisis en ambos pocillos, se consideraba la presencia de betalactamasas plasmídicas junto a la hiperproducción de betalactamasas cromosómicas.

3.5.7. Localización genética de las posibles nuevas betalactamasas.

3.5.7.1. Estudio de plásmidos.

Se estudió la presencia de plásmidos en aquellas cepas que presentaron nuevas betalactamasas, con el fin de llegar a su caracterización genética.

• *Extracción de ADN plasmídico.* El ADN plasmídico se extrajo siguiendo el protocolo de Harstein y col. (1990) con ligeras modificaciones. Se resuspendió el crecimiento bacteriano correspondiente a la extensión de media placa de agar BHI, incubada 18 horas a 30° C, en 3 ml de NaCl 2,5 M - EDTA 10 mM (pH 8,0). Se centrifugó 15 min. a 2500 g, se resuspendieron las células en 900 µl de sacarosa 20%-Tris 50 mM - EDTA 10 mM (pH 8,0), 0,5 ml de CTAB (0,5%) (bromuro de cetil-trimetil-amonio) y 0,5 ml de Triton X-100 (1%). Se incubó 15 min. en un baño a 56°C y se centrifugó a 33000 g 45 min. a 20° C, en una centrífuga Sorvall. Se separó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de CTAB (0,5%). Se incubó en hielo 10 min. y se centrifugó 15 min. a 2500 g. El precipitado se disolvió en 250 µl de NaCl 2,5 M - EDTA 10 mM (pH 8,0) y 500 µl de TE 10:1 pH 8,0. Se añadió 3 µl de ARNsa (500 µg/ml) y se incubó 30 min. a 37°C. Las proteínas fueron extraídas con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (2 veces), y el ADN plasmídico se precipitó con un volumen igual de isopropanol. Se centrifugó, se dejó secar y se disolvió en 60 µl de agua destilada estéril.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa 0,7% en tampón TBE 0,5X. Se añadieron 20 µl de muestra con 5 µl de tampón de carga en cada pocillo. Las condiciones de electroforesis fueron 18 horas a 30 V. Las bandas se compararon con otras de peso molecular conocido (plásmidos de *E. coli* I145 e I148).

3.5.7.2. Curado de plásmidos.

Este estudio se realizó con el fin de demostrar el papel de ciertos plásmidos en la resistencia antimicrobiana de *Acinetobacter*.

Se siguió un protocolo que utiliza bromuro de etidio, en diluciones dobles seriadas de 16 a 1024 mg/L, como agente *curante*. A partir de un cultivo de 18 horas en BHI, se realizó una dilución al 1/100 y ésta se inoculó en un medio líquido (LB), que contenía cada una de las diluciones de bromuro de etidio. Se incubaron a 37° C durante 18 horas. El medio con mayor concentración de bromuro de etidio y con crecimiento bacteriano, se diluyó de nuevo hasta conseguir un recuento aproximado de 200-300 col/placa, al resembrarlo en agar Mueller-Hinton. Las colonias crecidas se replicaron con un terciopelo estéril en placas de agar con y sin antibiótico. Se consideró que, las colonias que sólo habían crecido en las placas sin antibiótico, habían perdido algún plásmido de resistencia a dicho antimicrobiano (Arthur, 1985).

Se comprobó la pérdida del plásmido de resistencia mediante la comparación de su perfil plasmídico con el de la cepa parenteral. Al mismo tiempo se determinó la CMI para comprobar la disminución de la resistencia antimicrobiana tras la pérdida del plásmido, y se determinó el pI para demostrar la ausencia de la betalactamasa codificada por dicho plásmido.

3.6. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.

3.6.1. Perfil de proteínas de membrana (OMPs).

- *Extracción de las proteínas de membrana externa.*

Se siguió el protocolo de Martínez-Martínez y col. (1996). El crecimiento de las cepas se realizó a partir del cultivo en medio sólido agar Mueller-Hinton. Se sembraron 4 a 5 colonias en 5 ml de caldo Mueller-Hinton, que se incubó a 37°C durante 18 h en agitación. Se inocularon 36 ml de caldo Mueller-Hinton precalentado a 37°C con 4 ml del cultivo anterior, que se incubó durante 4 h, a 37°C. Las bacterias se pusieron en un baño de hielo y se centrifugaron a 4000 g durante 15 min. a 4°C. Se lavaron con 20 ml de NaPO₄ 10mM (pH 7,2) y se resuspendieron en 5 ml del tampón anterior.

- *Solubilización de las membranas celulares.*

La suspensión bacteriana se sonicó durante 5 pulsos de 60 segundos cada uno (manteniendo 60 segundos de descanso entre cada pulso) con frío constante. Posteriormente se comprobó el descenso de la turbidez de la suspensión, midiendo la disminución de la absorbancia a 650 nm. La suspensión se centrifugó a 4000 g durante 10 min. a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a 13.000 rpm durante 45 min. a 4°C. El sedimento se resuspendió con 2 ml de sarkosyl al 2% y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. (Filip, 1973). Se centrifugó a 4.000 g durante 30' y a 4 °C, y el sedimento se lavó con 750 µl de Tris 0,0625 M (pH 6,8). Se resuspendió en unos 80 µl de Tris 0,0625 M pH (6,8). Las muestras se mantuvieron congeladas a -30°C.

- *Determinación de la concentración de proteínas.*

La concentración de proteínas se tituló siguiendo el método de Bradford (1976).

Para determinar la concentración de proteínas más adecuada que permitiera la visualización y mejor discriminación de los diferentes perfiles de OMPs, se realizó la electroforesis con 4 muestras utilizando 3 concentraciones diferentes de cada una (1, 2 y 5 μg en 2 muestras y 1, 5 y 10 μg en otras 2 muestras).

- *Preparación de las muestras y carga del gel.*

Se preparó un volumen final de muestra de 20 μl para cargar en cada pocillo del gel.

Para ello se añadió a 10 μl de cada muestra, 8,5 μl de tampón de muestra 2X (TRIS 0,0625 M pH 6,8, glicerol al 10%, SDS 2%), 0,5 μl de solución de azul de bromofenol 0,1% y 1 μl de 2-mercapto-etanol al 10%. Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 min.

- *Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).*

El análisis electroforético de las proteínas de membrana externa mediante geles SDS-PAGE. Se realizó con una concentración de poliacrilamida al 14% (acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%) para el gel separador, y de 6% para el gel superior, utilizando el tampón de Laemmli (Laemmli, 1970).

La electroforesis se realizó en cubetas Mini-protean II cell de Bio-Rad, aplicándose un voltaje de 120 V durante 1h. Se utilizó un marcador de peso molecular “no teñido” estándar, que incluía proteínas de 6,5 a 200 kD. El marcador se preparó de igual modo que las muestras para la electroforesis SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie durante 30 min. y se destiñeron con una mezcla de metanol: agua: ácido acético

glacial 5:5:1 durante 2h aproximadamente. Los geles se secaron empleando el sistema comercial *DryEase*, (NOVEX, San Diego) durante 12h, y posteriormente se fotografiaron.

- *Observación del perfil de OMPs.*

El perfil de bandas de OMPs se comparó visualmente. Se estableció el peso molecular de las OMPs principales mediante su comparación con el peso molecular de las bandas del marcador de peso molecular.

4. RESULTADOS.

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE MÉTODOS FENOTÍPICOS.

4.1.1. Sistema API 20 NE.

En la figura 4.1 se presenta una fotografía del sistema API 20 NE como sistema de identificación de *Acinetobacter baumannii*.

Todos los aislamientos de este estudio se identificaron mediante el sistema API 20 NE como *Acinetobacter baumannii*. Sin embargo, existen diferencias en los porcentajes de positividad para cada una de las pruebas bioquímicas empleadas. En la tabla 4.1 se presenta el porcentaje de aislamientos del estudio que producen una reacción positiva para cada prueba bioquímica. Se puede apreciar que la totalidad de las cepas asimilan malato y caprato.

La tabla 4.2 representa las pruebas bioquímicas con resultado negativo para la totalidad de los microorganismos estudiados.

4.1.2. Hemólisis y Temperatura de crecimiento.

Mediante la producción o ausencia de hemólisis en agar sangre, y el crecimiento a las diferentes temperaturas de 30, 37 y 44° C, se confirmó que el total de los aislamientos de este estudio pertenecen al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*.

Figura 4.I

Identificación de *Acinetobacter baumannii* mediante el sistema API 20 NE.

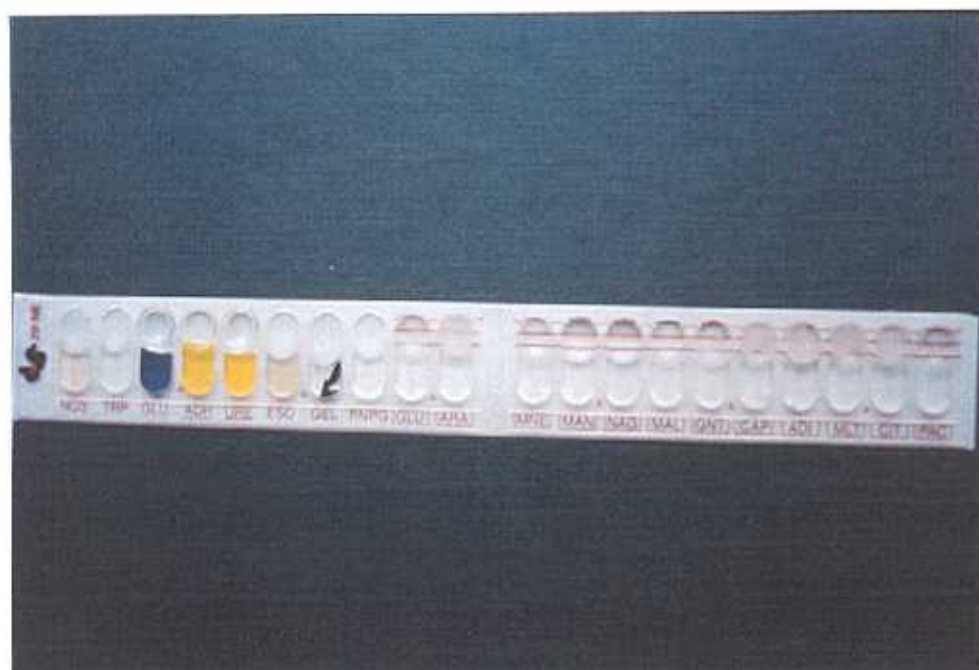


Tabla 4.1.

Porcentaje de pruebas positivas por el sistema API 20 NE.

Prueba bioquímica	número aislamientos (%)
Asimilación de malato	156 (100%)
Asimilación de caprato	156 (100%)
Asimilación de fenil-acetato	155 (99,3%)
Asimilación de arabinosa	154 (98,7%)
Asimilación de adipato	123 (78,8%)
Asimilación de citrato	98 (62,8%)
Asimilación de glucosa	62 (39,7%)
Asimilación de gluconato	5 (3,2%)
Asimilación de maltosa	3 (1,9%)
Asimilación de N-acetil glucosamina	1 (0,6%)
Asimilación de manitol	1 (0,6%)

Tabla 4.2.

Pruebas bioquímicas con resultado negativo para el total de los microorganismos estudiados.

Reducción de nitratos a nitritos
Reducción de nitratos a grupo azo
Formación de indol
Fermentación de la glucosa
Arginina hidrolasa
Hidrólisis de la esculina
Hidrólisis de la gelatina
β -galactosidasa
Asimilación de manosa

4.2. ESTUDIOS DE TIPADO.

4.2.1. Métodos fenotípicos.

4.2.1.1. Biotipado por el sistema API 20 NE.

Mediante el biotipado con el sistema API 20 NE se encontraron 14 biotipos diferentes entre los 156 aislamientos estudiados. Ciento treinta y seis aislamientos (87,1%) se incluyeron en 3 biotipos mayoritarios: (0001073 con 78 aislamientos, 0041073 con 31 aislamientos y 0041053 con 27 aislamientos). En cada uno de los 11 biotipos restantes se incluyeron de 5 a 1 aislamientos. En las tablas 4.3 y 4.4 se reflejan estos datos.

4.2.1.2. Biotipado por el sistema de Bouvet y Grimont.

Mediante el biotipado según el método descrito por Bouvet y Grimont (1987) se encontraron 11 biotipos diferentes entre los 156 aislamientos estudiados. Noventa y nueve aislamientos (63,4%) se incluyeron en el biotipo 1, veintinueve (18,5%) en el biotipo 8, y seis (3,8%) del total de aislamientos se incluyeron en el biotipo 9. De manera minoritaria se obtuvieron los biotipos 3, 4, 5, 10, 12, 15, 16, y 18, distribuidos entre los aislamientos restantes. En la tabla 4.5 se reflejan estos datos.

Tabla 4.3.

Biotipos mayoritarios definidos por el sistema API 20 NE.

Biotipo API	Aislamientos	Total 136 (87,1%)
000 1073	1, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 27, 28, 32, 34, 35, 36, 38, 39, 44, 46, 47, 48, 50, 52, 54, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 87, 88, 90, 91, 94, 96, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 109, 113, 114, 116, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 145, 151, 152	78 (57,3%)
004 1073	5, 9, 10, 12, 14, 18, 26, 37, 40, 41, 42, 43, 51, 56, 58, 76, 78, 81, 83, 85, 86, 89, 99, 105, 132, 133, 149, 150, 153, 154, 155	31 (22,7%)
004 1053	2, 24, 29, 30, 33, 49, 53, 55, 97, 111, 112, 124, 125, 130, 131, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 146, 148, 156	27 (19,8%)

Tabla 4.4.

Biotipos minoritarios definidos por el sistema API 20 NE.

Biotipo API	Aislamientos	Total 20(12,8%)
000 1053	3, 23, 45, 95, 144	5 (25)
004 1473	4, 25, 115, 117	4 (20)
000 1273	66, 72	2 (10)
000 1072	17, 31	2 (10)
000 0073	16	1 (5)
000 1071	92	1 (5)
000 1173	93	1 (5)
000 1473	107	1 (5)
000 5073	110	1 (5)
004 1253	134	1 (5)
000 0053	147	1 (5)

Tabla 4.5.

Distribución de los aislamientos de *Acinetobacter* según el perfil de biotipado de Bouvet y Grimont (B y G).

Tipos biotipado B y G	Cepas	Total: 156 (100%)
I	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 46, 47, 48, 50, 51, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 113, 114, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 126, 127, 128, 129, 138, 153, 154	99 (63,4%)
8	43, 44, 55, 56, 111, 112, 116, 124, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 151, 152, 156	29 (18,5%)
9	2, 18, 27, 28, 30, 125,	6 (3,8%)
OTROS (3, 4, 5, 10, 12, 15, 16, 18)	24, 26, 52, 53, 115, 117, 3, 14, 21, 23, 20, 25, 29, 45, 49, 13, 149, 150, 155, 31, 92	22 (14,1%)

4.2.1.3. Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs).

Se observó un perfil de OMPs muy similar en todos los aislamientos estudiados. La presencia de 3 OMPs principales predominó en la mayoría de las cepas.

El peso molecular (pm) se averiguó, primero mediante su comparación visual con el patrón de bandas de peso molecular, y se confirmó posteriormente mediante un programa informático. Una de las 3 OMPs principales tenía un pm de 42 kD, la siguiente de 27 kD, y la tercera de 17 kD.

Según los patrones definidos en el apartado de material y métodos, la mayoría de los 55 aislamientos incluidos en este estudio (42 (76,3%)) se agruparon en un mismo tipo, al que se le dió el número 1. A este tipo pertenecían todos los aislamientos que presentaban como bandas principales las 3 OMPs anteriormente descritas. El resto de cepas (13 (23,6%)) presentaban patrones similares al patrón 1, puesto que en la mayoría de ellos existía al menos una de las OMPs principales, pero con ciertas diferencias, que les impidió agruparse entre sí. Se consideró, por tanto, que cada una de estas 13 cepas tenía un patrón de proteínas de membrana externa diferente.

En la tabla 4.6 se muestra la distribución de las cepas según el perfil de OMPs. En la figura 4.II se muestran los diferentes perfiles de OMPs obtenidos mediante SDS-PAGE.

Tabla 4.6.

Distribución de los aislamientos de *Acinetobacter* según el perfil de OMPs.

Tipos perfil OMPs	Cepas	Total: 55 (100%)
1	21, 23, 24, 25, 28, 32, 33, 36, 38, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 54, 55, 58, 62, 63, 71, 74, 79, 80, 86, 90, 91, 98, 101, 103, 107, 109, 111, 113, 114, 118, 144, 146, 149, 150, 153, 155	42(76,3%)
2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,	5, 17, 29, 53, 78, 84, 92, 94, 102, 106, 116, 152, 154	13(23,6%)

Figura 4.II.

Comparación de diferentes perfiles de OMPs obtenidos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter*.

Figura 4.II-A.

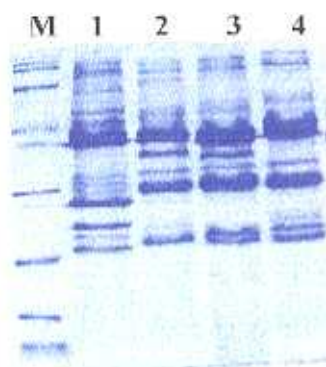
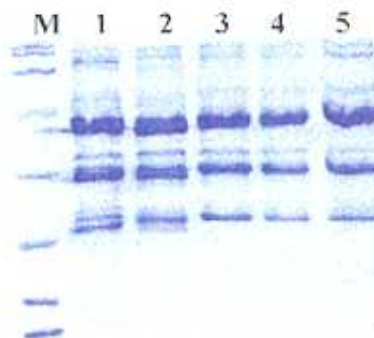
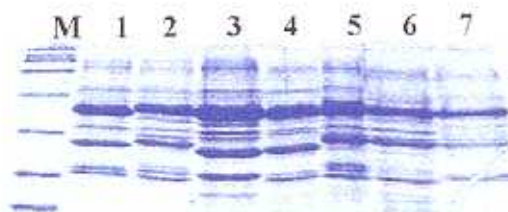


Figura 4.II-B.



M: marcador de peso molecular; líneas 2A, 3A, 4A, 1B, 2B, 3B, 4B y 5B: perfil de OMPs tipo 1; línea 1A: diferente perfil de OMPs.

Figura 4.II-C.



M: marcador de peso molecular; líneas 1, 2, 6 y 7: perfil de OMPs tipo 1; líneas 3, 4 y 5: diferentes perfiles de OMPs.

4.2.2. Métodos genotípicos. REP-PCR.

- *PCR con iniciadores rep 1 y rep 2.*

En el análisis con rep-PCR se observaron patrones compuestos por 1 a 5 fragmentos, que oscilaban entre 200 y 2000 pb, originando 3 tipos predominantes, que contenían diferentes subtipos. El resto de patrones correspondía a tipos no agrupables entre sí (23 tipos). Se apreciaron además unas bandas de menor intensidad, pero no fueron consideradas para definir los perfiles. En la tabla 4.7 se refleja la distribución de los aislamientos estudiados en los diferentes patrones de bandas observados. En las figuras 4.III-A a 4.III-D podemos observar algunos de los perfiles obtenidos con PCR utilizando iniciadores rep 1 y rep 2.

- REPRODUCIBILIDAD DE REP-PCR. Al repetir el ensayo con una misma cepa 6 veces en días distintos, se produjeron ligeras variaciones con respecto a las bandas menos intensas. Sin embargo, las bandas más intensas, que definían el tipo, fueron reproducibles.

4.2.3. Comparación entre los métodos de tipado.

En este apartado se presentan los resultados de la distribución de aislamientos obtenida con los diferentes métodos empleados (tablas 4.8 a 4.13). De estos resultados se deduce que, en general se mostró una buena correlación entre la mayoría de los métodos fenotípicos y la rep-PCR. Por este motivo se consideró a este método genotípico como método de referencia y se utilizó para diferenciar entre grupos de cepas relacionadas genéticamente y cepas no relacionadas.

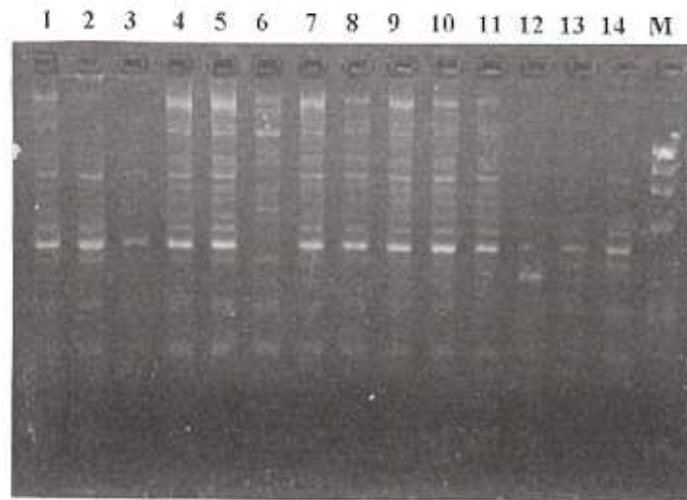
Tabla 4.7.

Distribución de los aislamientos estudiados por rep-PCR.

Perfil de REP-PCR	Aislamientos incluidos	nº aislamiento
A	1, 6, 8, 16, 22, 32, 34, 37, 39, 44, 47, 51, 57, 64, 66, 74, 76, 80, 81, 85, 87, 89, 90, 99, 113, 114, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 129	37
A1	7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 19, 20, 26, 29, 35, 41, 42, 46, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 65, 69, 72, 73, 75, 79, 82, 83, 88, 91, 93, 96, 110, 153	35
A2	36, 40, 48, 62, 67, 68, 70, 71, 86	9
B	14, 33, 43, 45, 50, 63, 95, 97, 112, 125, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 151, 156	28
B1	49, 111, 130	3
B2	2, 3, 18, 21, 23, 24, 27, 30, 148	9
C	98, 100, 101, 104, 105, 107, 108, 103	8
D	77, 78	2
E	117, 147	2
F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, α	4, 5, 17, 25, 28, 31, 38, 52, 53, 54, 84, 92, 94, 102, 106, 109, 115, 116, 149, 150, 152, 154, 155	23

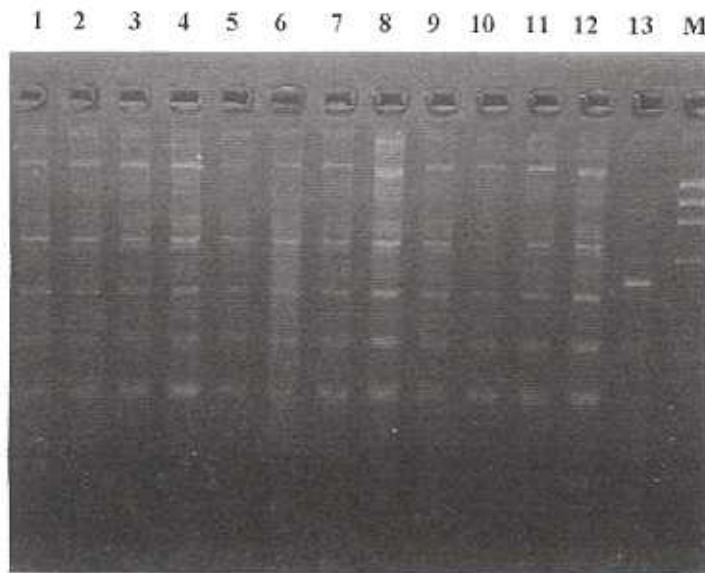
Figura 4.III.
Comparación de diferentes perfiles de rep-PCR obtenidos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter*.

Figura 4.III-A.



M. marcador de peso molecular; Líneas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14; genotipo A; línea 6; genotipo B.

Figura 4.III-B.

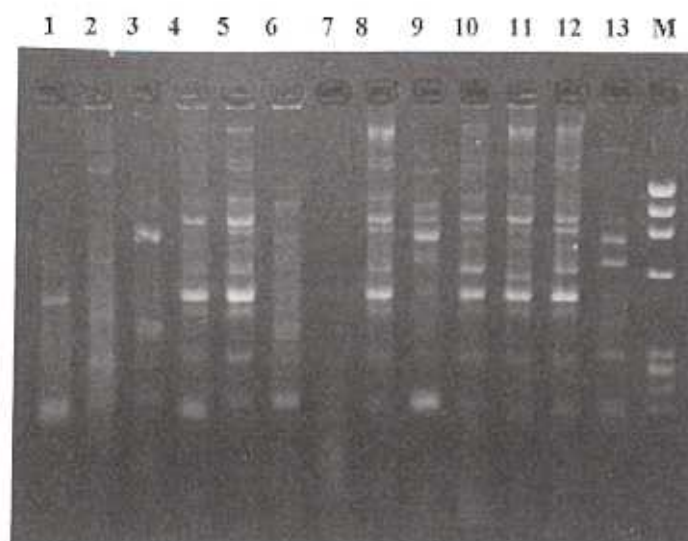


Líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; genotipo B; línea 13; genotipo A; M: marcador de peso molecular.

Figura 4.III.

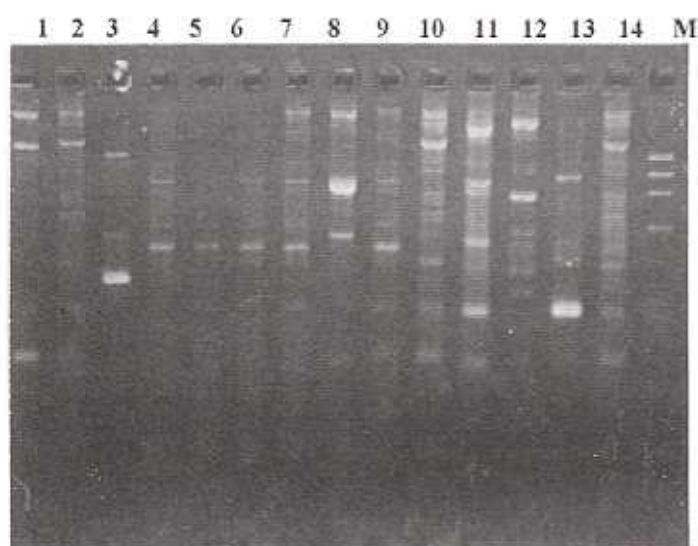
Comparación de diferentes perfiles de rep-PCR obtenidos en aislamientos clínicos de *Acinetobacter*.

Figura 4.III-C.



M: marcador de peso molecular; Líneas 4, 5, 8, 10, 11, 12: genotipo A; línea 1, 2, 3, 6, 7, 9, 13: diferentes genotipos.

Figura 4.III-D.



M: marcador de peso molecular; Líneas 1, 2, 10, 14: genotipo B; líneas 4, 6, 7, 9: genotipo A; líneas 3, 5, 8, 11, 12, 13: genotipos diferentes.

Tabla 4.8.

Distribución de los aislamientos según biotipo API 20 NE y tipado con rep-PCR.

API/rep-PCR	A	B	C	D	E	OTROS	TOTAL
000 1073	54	6	6	1	0	11	78
004 1073	19	5	1	1	0	5	31
004 1053	3	23	0	0	0	1	27
OTROS	5	6	1	0	2	6	20
TOTAL	81	40	8	2	2	23	156

Tabla 4.9.

Distribución de los aislamientos según el biotipado de Bouvet y Grimont (B y G) y rep-PCR.

B y G/ rep-PCR	A	B	C	D	E	OTROS	TOTAL
1	74	6	8	2	0	9	99
8	4	22	0	0	1	2	29
9	0	4	0	0	0	2	6
OTROS	3	8	0	0	1	10	22
TOTAL	81	40	8	2	2	23	156

Tabla 4.10.

Distribución de los aislamientos según el perfil de OMPs y rep-PCR.

OMPs/ rep-PCR	A	B	C	D	E	OTROS	TOTAL
1	19	11	4	0	0	8	42
OTROS	0	0	0	1	0	12	13
TOTAL	19	11	4	1	0	20	55

Tabla 4.11.

Distribución de los aislamientos según biotipo API y tipado de Bouvet y Grimont (B y G).

API 20 NE/ B y G	1	8	9	OTROS	TOTAL
000 1073	66	4	2	6	78
004 1073	21	4	1	5	31
004 1053	3	18	3	3	27
OTROS	9	3	0	8	20
TOTAL	99	29	6	22	156

Tabla 4.12.

Distribución de los aislamientos según biotipo API y perfil de OMPs.

API 20 NE / Perfil OMPs	1	OTROS	TOTAL
000 1073	25	6	31
004 1073	6	3	9
004 1053	6	2	8
OTROS	5	2	7
TOTAL	42	13	55

Tabla 4.13.

Distribución de los aislamientos según biotipado de Bouvet y Grimont (B y G) y perfil de OMPs.

Perfil OMPs/ B y G	1	8	9	OTROS	TOTAL
1	27	5	1	9	42
OTROS	7	1	0	5	13
TOTAL	34	6	1	14	55

4.2.4. Estudio de los diferentes grupos establecidos tras el tipado de los microorganismos.

Según los patrones obtenidos por rep-PCR se establecieron 5 grupos genéticamente relacionados, A, B, C, D y E, siendo A y B los predominantes, seguido en menor número de C. El resto de aislamientos, al presentar diferentes patrones, no se pudieron agrupar por lo que se consideraron cepas de aparición esporádica.

En la tabla 4.14 se observa la distribución de los aislamientos en los distintos genotipos y Servicios del hospital, incluyendo las de procedencia ambulatoria. Se observa que la mayoría de cepas esporádicas proceden del ambulatorio, mientras que las cepas relacionadas genéticamente están distribuidas en los diferentes Servicios del hospital. Hay que destacar un mayor predominio del grupo A en la UCI, seguido del grupo B.

En la tabla 4.15 se muestra la distribución de los genotipos según el origen de la muestra. Se observa que la mayoría de cepas relacionadas genéticamente proceden de muestras respiratorias, a diferencia de las cepas de aparición esporádica donde el origen de la muestra es diverso.

Tabla 4.14.

Distribución de los genotipos según la procedencia de los aislamientos de *Acinetobacter* estudiados.

Genotipos	Ingresados				AMB	TOTAL
	UCI	MIR	NRL	OTROS		
A (A, A1, A2)	60	7	3	11	0	81
B (B, B1, B2)	18	9	2	6	5	40
C	5	1	0	1	1	8
OTROS	9	2	1	6	5	27
TOTAL	94	19	6	25	12	156

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos; MIR: Medicina Interna; NRL: Neurología; AMB: origen ambulatorio.

Tabla 4.15.

Distribución de los genotipos según el origen de la muestra.

Genotipos	Tipo de muestra					TOTAL
	RESP	O	SAN	PUCA	OTRAS	
A (A, A1, A2)	42	7	8	12	12	81
B (B, B1, B2)	10	9	4	2	15	40
C	4	1	1	0	12	8
OTROS	12	9	3	2	1	27
TOTAL	68	26	16	16	30	156

RESP: muestras respiratorias; O: orina; SAN: sangre; PUCA: punta de catéter.

4.3. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro*.

4.3.1. Resultados del estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

4.3.1.1. Sensibilidad antimicrobiana a betalactámicos.

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana, expresados en CMI₅₀, CMI₉₀, intervalo y porcentaje de sensibilidad (%S) a los 15 antibióticos betalactámicos estudiados en el total de aislamientos, se muestran en la tabla 4.16.

Se observa en general, que los porcentajes de sensibilidad a betalactámicos son bajos. La escasa sensibilidad se observa, tanto en las penicilinas (de reducido y amplio espectro), como en las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación, con unos porcentajes que rondan, en ambos casos, en torno al 10-20%. Dentro de las cefalosporinas, se podría destacar una mayor actividad a ceftazidima y cefepima, con respecto a cefotaxima.

Los mayores porcentajes de sensibilidad corresponden a los carbapenémicos, imipenem, y meropenem (88,4 y 89,1% respectivamente), que presentan similares valores de CMI₅₀ y CMI₉₀. Hay que destacar, sin embargo la considerable proporción de aislamientos con elevada resistencia a estos antibióticos.

Respecto a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas no se demuestra una significativa reducción de la CMI al realizar dichas asociaciones; únicamente se observa una buena actividad *in vitro* en ampicilina-sulbactam, con un elevado porcentaje de cepas sensibles (84,6%).

Aunque no disponemos de puntos de corte para establecer el porcentaje de sensibilidad a los inhibidores solos, observamos que los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para ácido clavulánico y tazobactam fueron elevados, sin embargo sulbactam mostró una buena actividad *in vitro*, con valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ muy similares a los de ampicilina-sulbactam.

4.3.1.2. Sensibilidad antimicrobiana a antibióticos no betalactámicos.

Los resultados de los porcentajes de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos se muestran en la tabla 4.17. Se observa que colistina mantiene su buena actividad antimicrobiana presentando una sensibilidad del 100%.

Los aminoglucósidos presentan bajos porcentajes de sensibilidad, excepto tobramicina que muestra una buena actividad *in vitro*.

Otros antibióticos como ofloxacino y doxiciclina presentan valores de CMI muy elevados, destacando la muy escasa sensibilidad de fosfomicina.

Tabla 4.16.

Sensibilidad antimicrobiana in vitro de *Acinetobacter* spp. a los antibióticos

betalactámicos.

ANTIBIÓTICO	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	INTERVALO (µg/ml)	%S
Ampicilina	>128	>128	8->128	1,9
Piperacilina	128	1024	2->1024	10,2
Ticarcilina	64	512	2->1024	19,8
Cefotaxima	128	>128	4->128	8,9
Ceftazidima	32	>128	2->128	15,3
Cefepima	32	64	1->128	17,3
Imipenem	1	128	0,032->128	88,4
Meropenem	1	>128	0,125->128	89,1
Ácido clavulánico	32	>128	4->128	-
Sulbactam	8	32	0,25-64	-
Tazobactam	16	>128	1->128	-
Amoxicilina-clavulánico	32	>128	1->128	14,1
Ampicilina-sulbactam	2	16	0,125-64	84,6
Piperacilina-tazobactam	64	512	0,032-1024	37,8
Ticarcilina-clavulánico	32	>1024	0,064->1024	33,9

Tabla 4.17.

Sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Acinetobacter* spp. a los antibióticos no betalactámicos.

ANTIBIOTICO	CMI ₅₀ (µg/ml)	CMI ₉₀ (µg/ml)	INTERVALO (µg/ml)	%S
Amicacina	128	>128	0,064->128	24,3
Gentamicina	>128	>128	0,064->128	16
Tobramicina	8	32	0,064-128	47,4
Ofloxacino	16	32	0,032-64	30,7
Colistina	1	2	0,064-2	100
Rifampicina	4	8	1-32	4,4
Doxiciclina	32	>128	0,125->128	16
Fosfomicina	>128	>128	64->128	0,64
Azitromicina	64	64	0,5-64	12,8

4.3.2. Variación de la sensibilidad antibiótica en el período de tiempo estudiado.

La distribución de los aislamientos en el tiempo se muestra en la figura 4.IV. El mayor número de microorganismos (69 (44%)) apareció en el año 1995.

En las figuras 4.V y 4.VI se observa la evolución de la sensibilidad a todos los antimicrobianos estudiados, según los diferentes años de estudio. En las tablas 4.18 a 4.20 se muestran los valores de CMI_{50} y CMI_{90} para cada antimicrobiano, en cada año estudiado.

Cabe destacar, en general la disminución paulatina de la sensibilidad en la mayoría de los antibióticos según los años estudiados, especialmente en los carbapenémicos. Tobramicina sin embargo mantiene sus valores de CMI en los 3 años de estudio, al igual que algunos antibióticos de baja actividad tales como rifampicina y azitromicina. Como excepción, algunos betalactámicos como piperacilina-tazobactam y ampicilina-sulbactam tienen una actividad *in vitro* cada vez mayor, llegando a valores cercanos al 100% para este último antibiótico.

4.3.3. Variación de la sensibilidad según la procedencia de los microorganismos.

En las figuras 4.VII y 4.VIII se comparan los porcentajes de sensibilidad a todos los antibióticos estudiados según la procedencia de las cepas.

Se observa, en general, una mayor sensibilidad antibiótica en las cepas procedentes de enfermos de origen ambulatorio, que en las cepas de enfermos ingresados.

Figura 4.IV.

Distribución de cepas por años de aislamiento

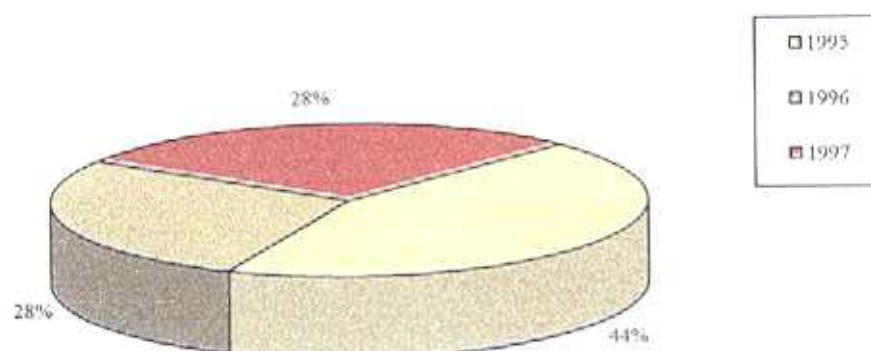


Tabla 4.18.

CMI₅₀/CMI₉₀ (µg/ml) de los antibióticos betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.

Antibióticos	1995 (n: 69)	1996 (n: 43)	1997 (n: 44)
AMP	>128/>128	>128/>128	>128/>128
PIP	256/1024	256/512	64/1024
TIC	64/256	64/512	32/>1024
AMC	32/64	>128/>128	32/>128
TZP	128/1024	128/>256	16/256
TICCL	64/>128	64/>1024	32/>1024
AS	8/16	2/8	1/8
SULB	4/16	4/16	1/16
CLAV	16/32	32/>128	16/>128
TAZ	16/>128	32/>128	8/64

Tabla 4.19.

CMI₅₀/CMI₉₀ (µg/ml) de los antibióticos betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.

Antibióticos	1995 (n: 69)	1996 (n: 43)	1997 (n: 44)
CEF	64/64	32/128	16/64
CTX	128/>128	>128/>128	64/>128
CAZ	32/128	32/>128	16/>128
IMP	0,5/1	1/8	1/>128
MEP	1/2	1/8	1/>128

Tabla 4.20.

CMI₅₀/CMI₉₀ (µg/ml) de los antibióticos no betalactámicos probados en los diferentes años de aislamiento de las cepas estudiadas.

Antibióticos	1995 (n: 69)	1996 (n: 43)	1997 (n: 44)
AK	64/>128	128/>128	128/>128
GN	>128/>128	>128/>128	>128/>128
TO	8/32	4/16	16/64
OFL	16/32	32/32	32/32
FO	>128/>128	>128/>128	>128/>128
DOX	128/>128	8/>128	8/64
RD	4/8	4/4	4/4
CT	2/2	1/2	1/2
AZIT	32/64	64/64	64/64

Figura 4.V.

Variación del porcentaje de sensibilidad a antibióticos betalactámicos estudiados en los diferentes años de aislamiento de los microorganismos.

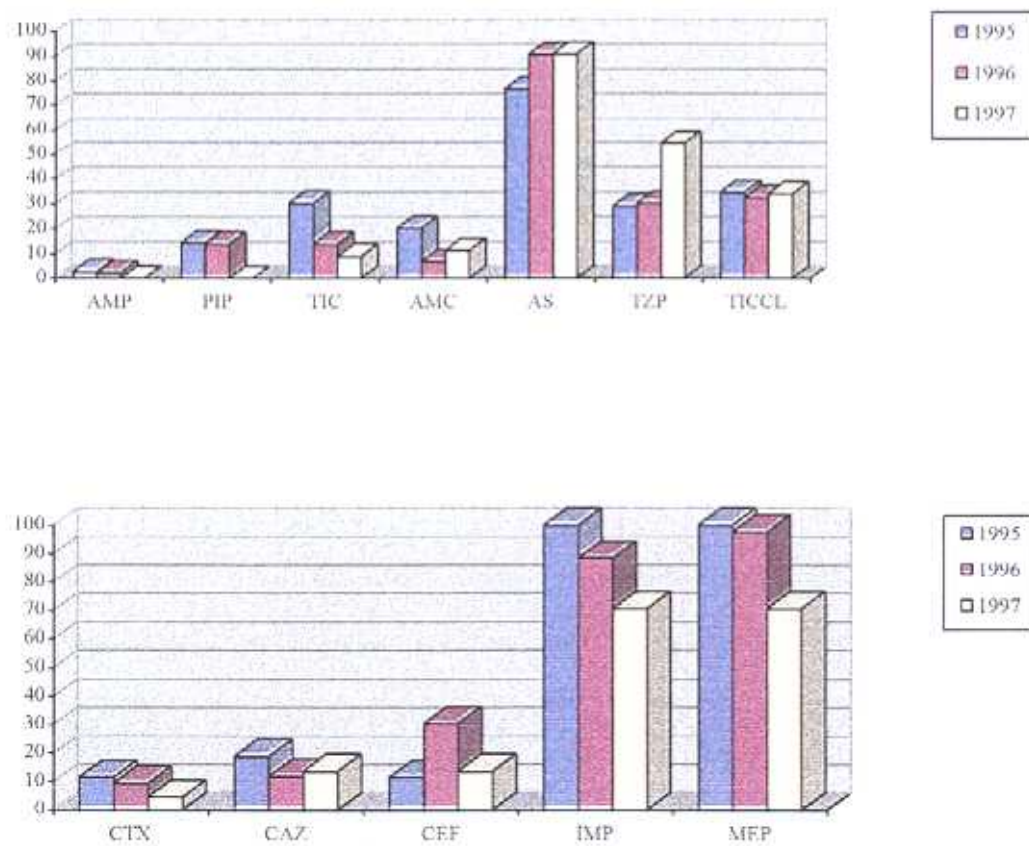


Figura 4.VI.

Variación del porcentaje de sensibilidad a los antibióticos no betalactámicos estudiados en los diferentes años de aislamiento de los microorganismos.

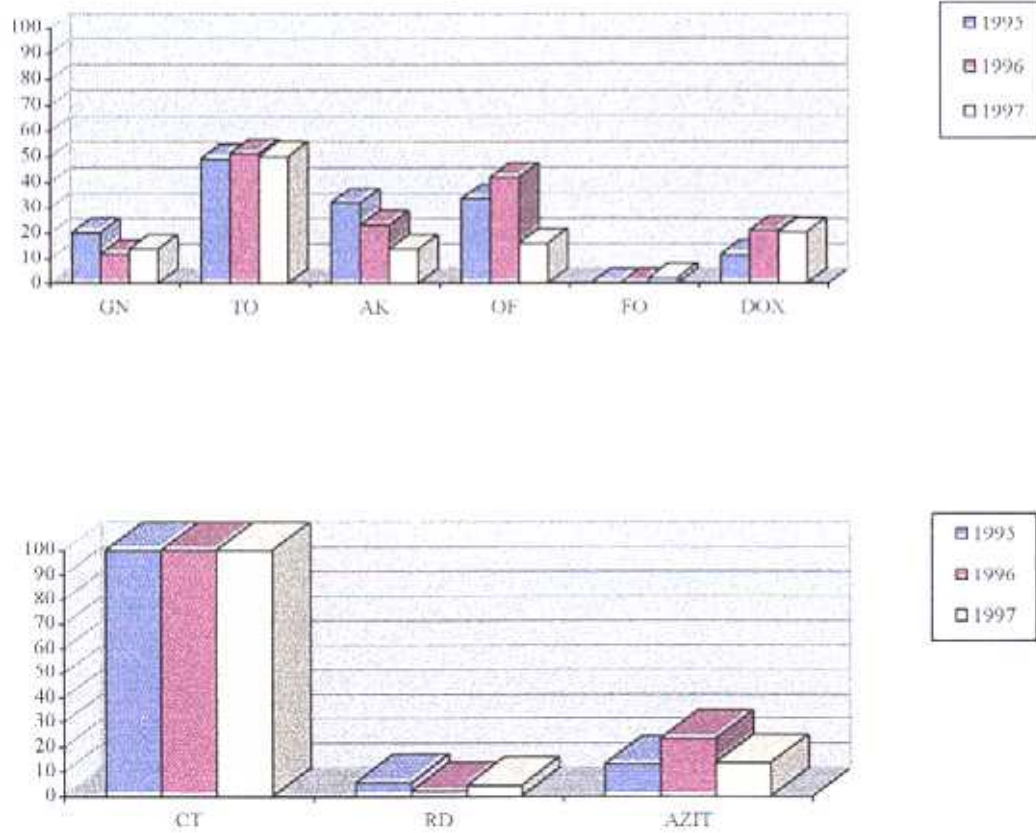


Figura 4.VII

Distribución de los porcentajes de sensibilidad a antibióticos betalactámicos según la procedencia de los aislamientos

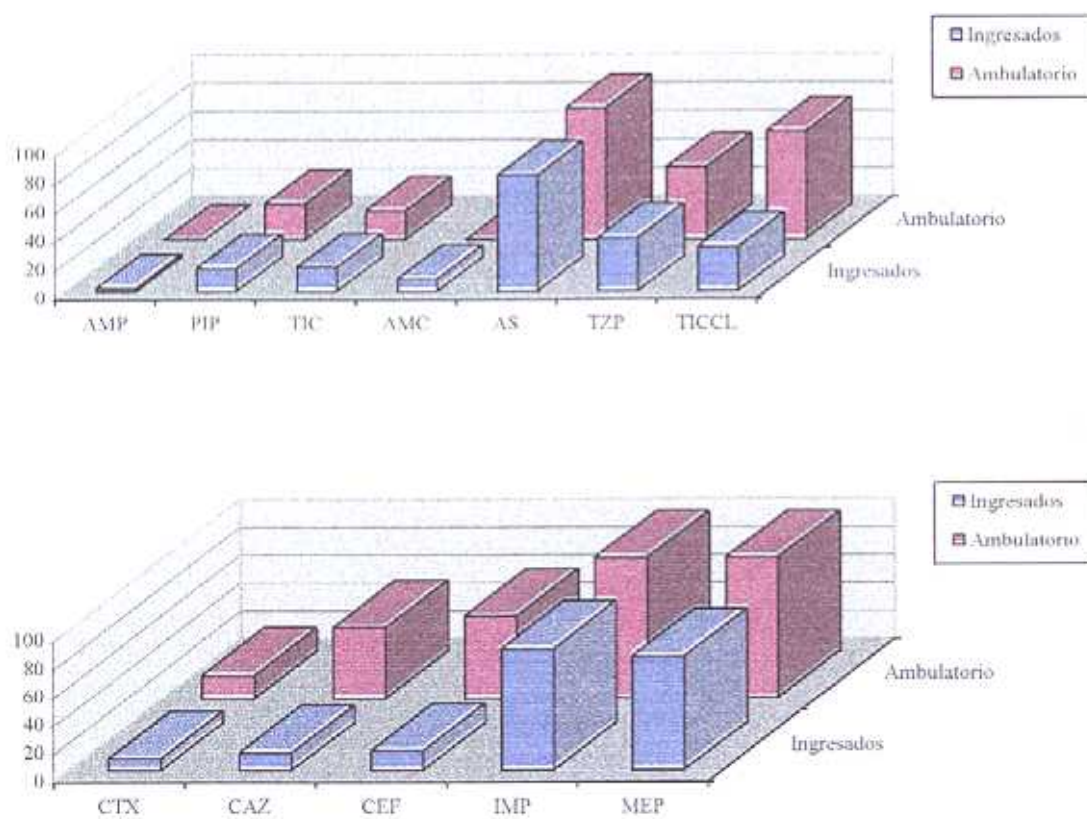
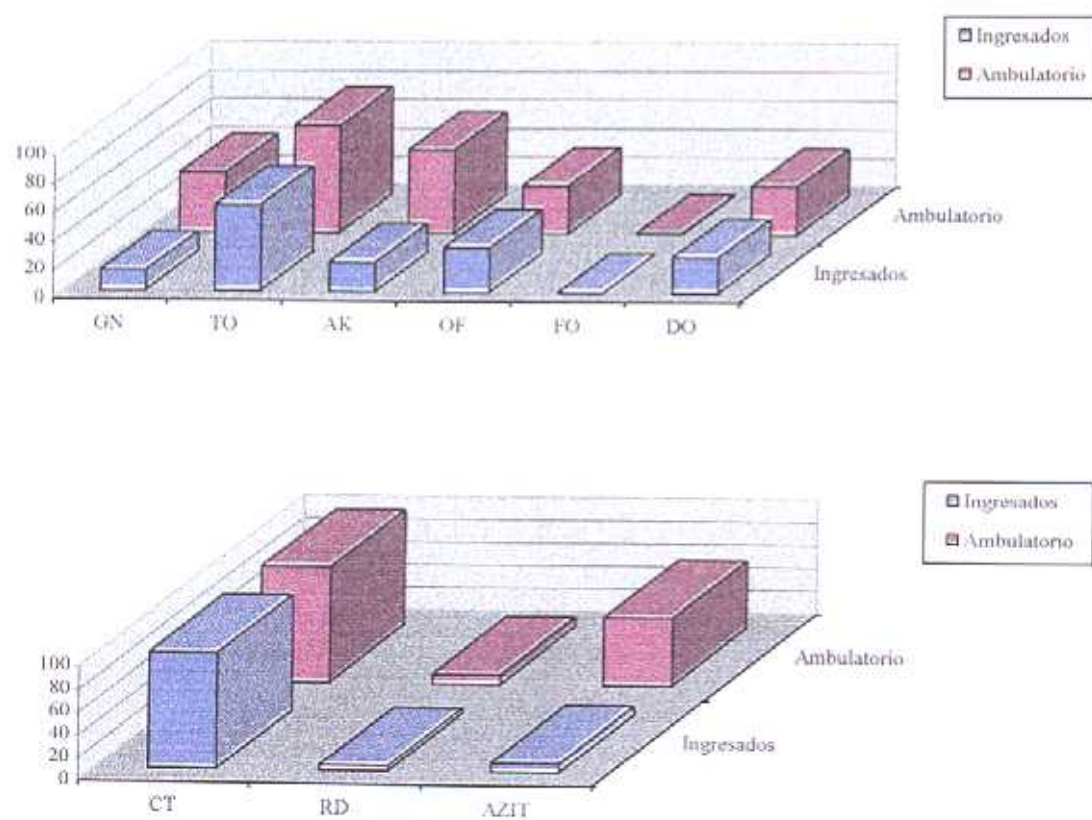


Figura 4.VIII

Distribución de los porcentajes de sensibilidad a antibióticos no betalactámicos según la procedencia de los aislamientos.



4.4. PERFILES DE RESISTENCIA.

Los resultados de los fenotipos de resistencia a betalactámicos según el criterio establecido por el NCCLS de 1998 (criterio A) demostraron el predominio de los aislamientos resistentes a todos los betalactámicos, a excepción de imipenem (68,5%). En segundo lugar destacaba el grupo III, al que pertenecen las cepas resistentes únicamente a cefalosporinas de tercera generación (12,8%). seguido del grupo V, donde los aislamientos presentaban resistencia a todos los antibióticos betalactámicos incluido imipenem. Los aislamientos pertenecientes al grupo I y II fueron minoritarios. Estos resultados se reflejan en la tabla 4.21 y figura 4.VII.

Dentro de los grupos III y IV hubo un predominio de cepas resistentes a las dos cefalosporinas (CAZ, CTX). Las cepas con resistencia a CAZ y CTX (14 aislamientos) predominaron sobre las cepas sensibles a CAZ (6 aislamientos) dentro del Grupo III. De igual modo, en el Grupo IV predominaron 100 aislamientos resistentes a ambas cefalosporinas frente a las 7 cepas sensibles a CAZ.

Según el criterio establecido por el NCCLS de 1997 para microorganismos no fermentadores (criterio B), y coincidiendo con el de años anteriores, se observó un mayor predominio de cepas pertenecientes al Grupo III (55,1%), seguido del Grupo IV (26,2%). De nuevo predominaron las cepas resistentes a ambas cefalosporinas (75 aislamientos) frente a 11 cepas sensibles a CAZ en el fenotipo III, al igual que en el IV (100% de las cepas resistentes a CTX y CAZ).

En los Grupos I, II, y V la distribución de las cepas fue similar a la clasificación de fenotipos según el criterio A. En la tabla 4.22 y figura 4.VIII se muestran estos resultados.

Tabla 4.21.

Perfiles de resistencia a betalactámicos en los aislamientos de *Acinetobacter* según el criterio A.

Perfiles de resistencia	Aislamientos (Nº %)
Grupo I	10 (6,4)
Grupo II	2 (1,2)
Grupo III	20 (12,8)
Grupo IV	107 (68,5)
Grupo V	17 (10,8)
TOTAL	156 (100)

Figura 4.VII

Distribución de los aislamientos de *Acinetobacter* spp. en los diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos.

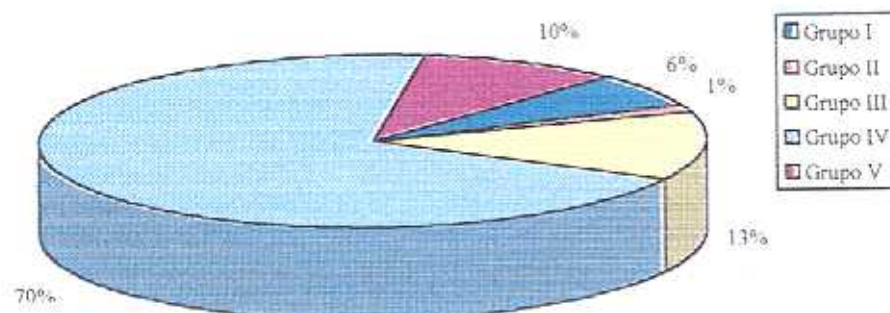


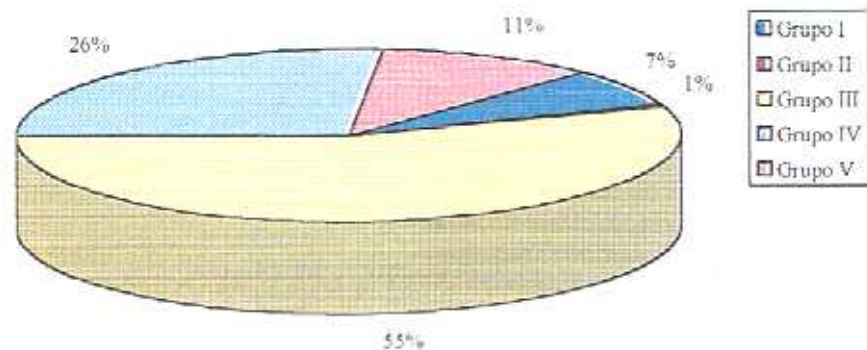
Tabla 4.22.

Perfiles de resistencia a betalactámicos en los aislamientos de *Acinetobacter* según el criterio B.

Perfiles de resistencia	Aislamientos (Nº %)
Grupo I	11(7)
Grupo II	1(0,6)
Grupo III	86(55,1)
Grupo IV	41(26,2)
Grupo V	17(10,8)
TOTAL	156 (100)

Figura 4. VIII.

Distribución de los aislamientos de *Acinetobacter* spp. en los diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos



4.5. ESTUDIO DE BETALACTAMASAS.

4.5.1. Detección cualitativa de la actividad betalactamasa.

Se observó, mediante el ensayo de la hidrólisis de la nitrocefina, que la mayoría de los 156 extractos enzimáticos estudiados, presentaban actividad betalactamasa (145 (92,9%)). De éstos, el 95,8% dieron la reacción de la nitrocefina positiva en un máximo de 2 minutos y solamente 6 extractos tardaron entre 3 y 5 minutos en dar la reacción positiva (tabla 4.23).

Tabla 4.23.

Distribución de los extractos enzimáticos según la actividad betalactamasa mediante la prueba de la nitrocefina.

Prueba de la nitrocefina (NCF)	Nº extractos (%)	NCF (+) en 2'	NCF (+) en >2-5'
NCF (+)	145 (92,9%)	139 (95,8%)	6 (4,1%)
NCF (-)	11 (7%)	-	-
TOTAL	156 (100%)	-	-

4.5.2. Determinación del pI mediante isoelectroenfoque.

En la determinación del pI por isoelectroenfoque, se observó que, la mayoría de los extractos enzimáticos NCF(+) (143) presentaban 1 o varias bandas de pI. Únicamente en 2 extractos NCF(+) no se demostró ningún pI. Al mismo tiempo, se observa cómo

estos extractos tardaron un tiempo mayor en dar la NCF(+) que los demás. En las tablas 4.24 y 4.25 se observa la relación de extractos que aún siendo NCF (+), pueden presentar o no bandas de pI, y la relación con el tiempo en positividad de la reacción de la nitrocefina.

- Entre aquellos extractos pI(+) se observó que el 87,4% presentaban una única banda de pI superior a 8. Utilizando geles de poliacrilamida, con un rango de anfolitos más estrecho (5,5 - 8,5), se intentó definir el pI lo más exacto posible. De este modo se dividieron los extractos enzimáticos anteriores en los grupos *a* y *b* (tabla 4.26), correspondiendo al grupo *a* (72%), aquellos extractos que presentaban el pI más cercano al cátodo (pI 8,5). Al grupo *b* (28%), pertenecieron aquellos con pI inferior a 8,5 pero superior a 8. Según el pI observado en ambos grupos, se sugirió la presencia de betalactamasas cromosómicas tipo cefalosporinasa en estos extractos enzimáticos.

- Un sólo extracto enzimático (0,69%) presentó 2 bandas de pI. Una de ellas se correspondía con la de las cepas del grupo *a*, mientras que la otra banda presentó un pI de 5,4. Estos datos parecen indicar la presencia de una cefalosporinasa cromosómica junto a una betalactamasa plasmídica tipo TEM-1, en dicho extracto enzimático.

- En dieciseis extractos enzimáticos (11,1%) se observó la presencia de una banda principal de pI en torno a 7,7, que aparecía junto a 3 bandas satélites (2 de ellas con pIs algo inferiores y una 3ª banda con pI próximo a 8) (figura 4.XI).

- Un único extracto (0,69%) presentaba un pI de 6,8-7, junto a 2 bandas satélites de pI algo inferior.

Tabla 4.24.

Comparación de la prueba de la reacción de la NCF con el pI de los extractos enzimáticos.

NCF/pI	pI (+)	pI (-)	TOTAL
NCF (+)	143	2	145
NCF (-)	0	11	11
TOTAL	143	13	156

Tabla 4.25.

Relación entre el pI y tiempo de positividad para la prueba de la nitrocefina.

NCF(+)/pI	pI(+)	pI(-)	TOTAL
NCF(+) en 2'	139	0	139
NCF(+) en >2-5'	4	2	6

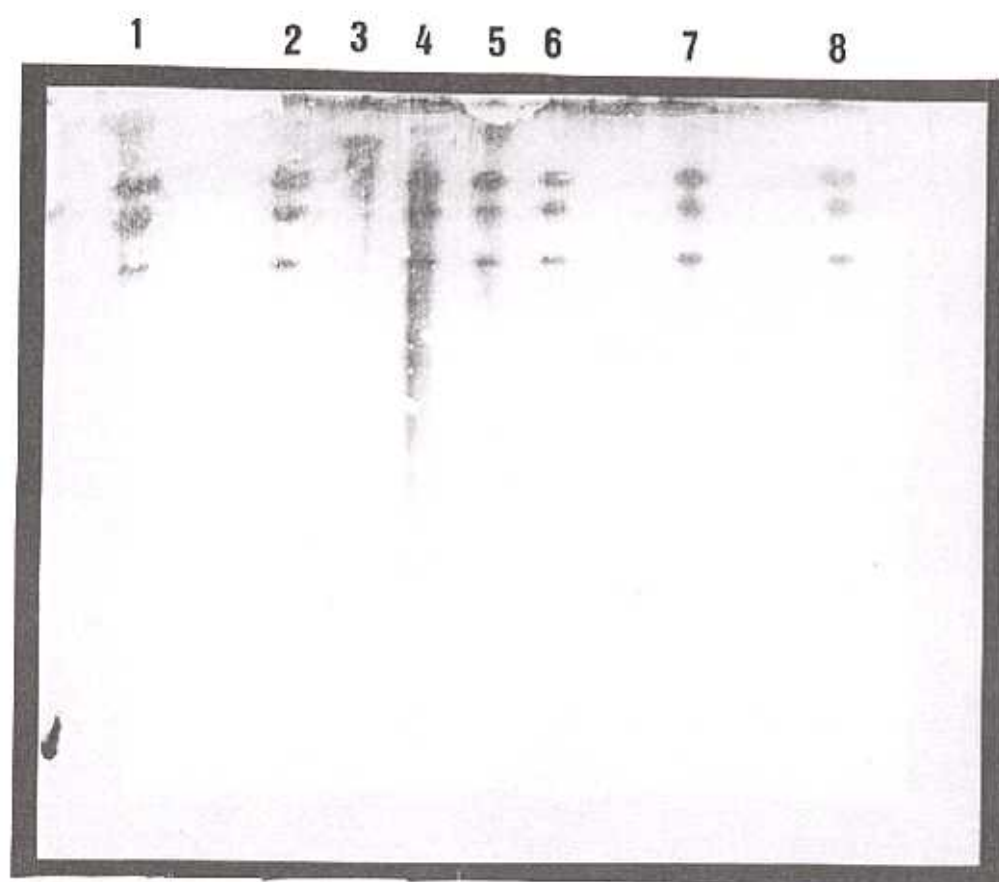
Tabla 4.26.

Distribución del pI en el total de extractos enzimáticos estudiados.

pI	Nº extractos pI(+) (%)
pI 8,5 (a)	90 (72%)
pI 8-8,5 (b)	35 (28%)
pI 5,4	1 (0,69%)
pI 7,7	16 (11,1%)
pI 6,8-7	1 (0,69%)
TOTAL	143 (100%)

Figura 4.XI.

Isoelectroenfoque de las betalactamasas de *Acinetobacter* en gel de poliacrilamida
(pH 3,5-9,5)



Líneas 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8: betalactamasas pI 7,7; línea 3: cefalosporinasa pI>8.

4.5.3. Caracterización de las betalactamasas.

4.5.3.1. Determinación del perfil inhibitorio.

4.5.3.1.1. Perfil inhibitorio mediante isoelectroenfoque.

Con el fin de hacer una caracterización preliminar de las betalactamasas anteriormente detectadas, se escogió un extracto enzimático representante de cada grupo con diferente pI, y se repitió la técnica de isoelectroenfoque añadiendo sustancias inhibitoras de pI. Se observó que las bandas de pI superiores a 8 (grupos *a* y *b*) no se inhibían por ácido clavulánico, aunque sí por cloxacilina y sulbactam. La banda de pI 5,4, se inhibía por ácido clavulánico y sulbactam, pero no por cloxacilina. Los extractos que presentaban betalactamasas con pI próximos a 7,7 y a 6,8 no se inhibían ni por ácido clavulánico, ni por sulbactam ni por cloxacilina.

4.5.3.1.2. Perfil inhibitorio mediante un ensayo cromogénico (Determinación cualitativa).

Como método confirmatorio al anterior se escogieron 87 extractos enzimáticos y se determinó el perfil inhibitorio de manera cualitativa, según el método espectrofotométrico de Papanicolau y col. (1990).

Se observó que la mayoría de los extractos estudiados (84 (96,5%)) correspondían a betalactamasas cromosómicas, puesto que se inhibían por cloxacilina, sulbactam y aztreonam, pero no por ácido clavulánico. Asimismo las 2 cepas en las que no se observaba banda de pI, pero sí actividad betalactamasa mediante la hidrólisis de nitrocefina, mostraron el mismo perfil

de inhibición que las demás cefalosporinasas cromosómicas, por lo que fueron incluidas en este grupo. Un único extracto (1,1%) mostraba una clara inhibición por sulbactam y aztreonam, no se inhibía por cloxacilina, y no presentaba una clara inhibición por ácido clavulánico. Este extracto correspondía a la cepa que, mediante la determinación del pI había mostrado 2 betalactamasas: una enzima tipo TEM-1 y otra cefalosporinasa. Por este motivo se explicaron los resultados de perfil de inhibición contradictorios en este extracto.

Dos extractos enzimáticos (2,2%) presentaban un perfil inhibitorio desconocido, ya que no mostraron inhibición por ninguno de los betalactámicos estudiados. En la figura 4.XII se observa un ejemplo de la inhibición de la mayoría de los extractos por cloxacilina (color amarillo), y la ausencia de inhibición por sulbactam y ácido clavulánico (color rojo).

Estos resultados confirmaron los resultados del apartado anterior, y permitieron clasificar las betalactamasas, según el esquema de K. Bush (1995), en 3 grupos:

- Cefalosporinasas cromosómicas. Clase C, grupo 1.
- Enzimas plasmídicas tipo TEM-1. Clase A, grupo 2b.
- Nuevas betalactamasas.

Al mismo tiempo, se pudo estudiar la distribución de las betalactamasas en los aislamientos clínicos de este trabajo, cuyos resultados se representan en la tabla 4.27.

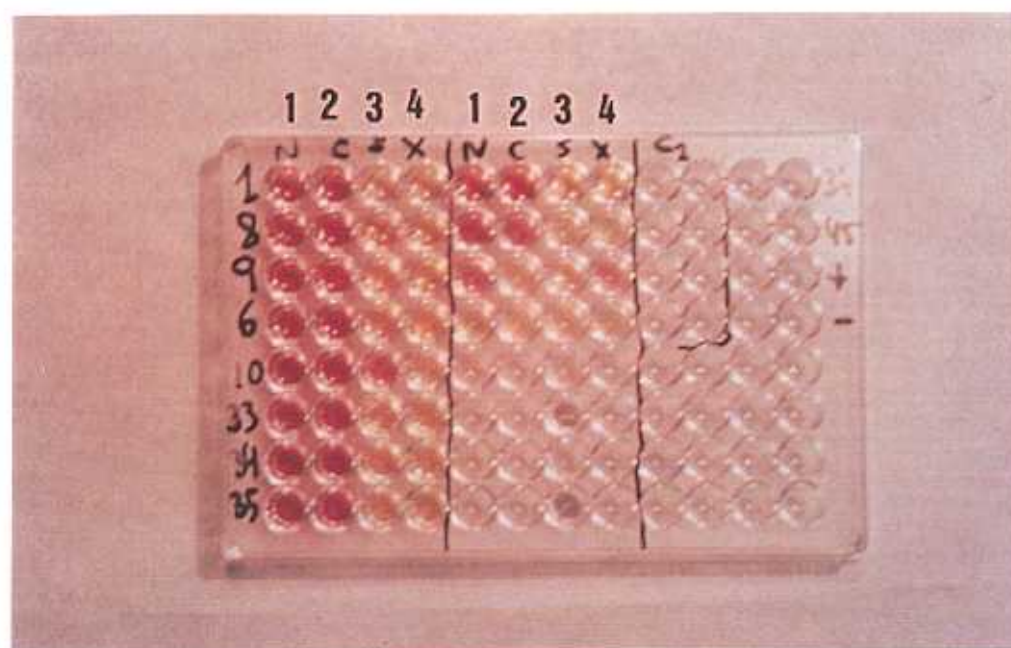
Tabla 4.27.

Distribución de las betalactamasas en los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp.

Betalactamasas	Cepas Nº(%)
Cefalosporinasas (Csas) (pI>8)	127(81,4)
Csas (pI >8) + TEM-1 (pI 5,4)	1(0,64)
Nuevas βlsas (pI 7,7)	16(10,2)
Nuevas βlsas (pI 6,8-7)	1(0,64)
βIsa (-)	11(7)
TOTAL	156(100)

Figura 4 XII.

Perfil inhibitorio cualitativo de las betalactamasas de *Acinetobacter*.



Columna 1: NCF (+) en ausencia de inhibidores; columna 2: ausencia de inhibición por CLAV; columnas 3 y 4: inhibición por SULB y CLOXA respectivamente.

4.5.3.2. Caracterización de betalactamasas cromosómicas.

Una vez encuadradas la betalactamasas en los diferentes grupos, de acuerdo con los resultados anteriores, se procedió a estudiar con más profundidad las betalactamasas cromosómicas, mediante la determinación del perfil inhibitorio de manera cuantitativa y mediante el estudio del perfil de hidrólisis.

4.5.3.2.1. Perfil de inhibición de las betalactamasas cromosómicas.

De los 84 extractos enzimáticos que mediante el pI y el perfil de inhibición habían mostrado únicamente actividad cefalosporinasa, se escogieron 40 extractos para estudiar el perfil inhibitorio de manera cuantitativa.

4.5.3.2.1.1. Determinación cuantitativa.

Se determinó el porcentaje de máxima inhibición de las betalactamasas.

• Reproducibilidad:

La representación de los resultados de inhibición por ácido clavulánico, cloxacilina y sulbactam para los enzimas de referencia TEM-1 se observan en la tabla 4.28.

Tabla 4.28.

Perfil inhibitorio de los enzimas de referencia TEM-1, expresado como la media de porcentajes de máxima inhibición

Origen β -lactamasa	Ácido clavulánico	Cloxacilina	Sulbactam
<i>H. influenzae</i>	86,5	11,8	85,2
<i>E. coli</i>	84,5	17,4	84,3

4.5.3.2.1.2. *Máximo porcentaje de inhibición.*

La mayoría de las betalactamasas presentaron un máximo porcentaje de inhibición entre los 2 y 5 minutos. Estos resultados demuestran una gran similitud entre ellas. Los valores de máxima inhibición no superaron el 45% en ningún extracto enzimático. Todos ellos mostraron una inhibición para cloxacilina, sulbactam y aztreonam entre 80-90%. Los máximos porcentajes de inhibición para CINA y EDTA fueron inferiores al 30% en todos los casos. En las tablas 4.29 y 4.30 se muestra el perfil de inhibición de algunas betalactamasas cromosómicas procedentes de cepas con diferente genotipo, expresado como el valor medio del máximo porcentaje de inhibición.

Se estudió la variación de la inhibición con el tiempo, expresada mediante el valor de “pendiente”, para aquellas enzimas que presentaran un porcentaje de inhibición superior al 25% en alguno de los inhibidores; de este modo se podían diferenciar las betalactamasas con porcentajes de inhibición muy similares. En las tablas 4.31 y 4.32 se comparan las diferencias entre los perfiles de inhibición (mediante la pendiente) y pI de algunas betalactamasas de cepas con diferente genotipo. En las figuras 4.XIII y 4.XIV se ofrecen algunos ejemplos de variación de la inhibición con el tiempo.

Se puede observar, en general una relación entre el pI α con una “pendiente” superior a 0,3 para cloxacilina y aztreonam, dentro de las cepas agrupadas genotípicamente. Sin embargo las cepas no agrupables no muestran relación entre el pI y perfil de inhibición.

Tabla 4.29.

Perfiles de inhibición de betalactamasas cromosómicas.

cepas	Genotipo	A. clavulánico	Cloxacilina	Sulbactam	Aztreonam	EDTA	CINa
44	A	15	93,6	83,8	93,2	16,5	19,8
90	A	20	94	82	94	11,6	10
32	A	11,5	93,4	88,4	93,9	12	16
55	A1	10	90,4	91,4	91,4	15,9	15,9
86	A2	18,2	93,4	87,7	92,9	15,5	36
144	B	42,8	93,7	90,8	94,8	10,8	14,4
50	B	8,9	82	80,4	88,8	18,4	15
98	C	13,6	96,3	82,1	94,2	10,8	14,4
107	C	12,8	94,4	87,2	95	11,6	15,8

Tabla 4.30.

Perfiles de inhibición de betalactamasas cromosómicas.

Cepas	Genotipo	A. clavulánico	Cloxacilina	Sulbactam	Aztreonam	EDTA	CINa
152	Y	39	90	92	89	44	19
155	α	45	95	94	95	44	42
150	X	27	89,2	93,7	86	25	16
149	W	40	87	88	93,4	24	16,5
28	J	45	89	92,2	89	21	13
25	I	10	86	85	87	7	6
54	Ñ	3	91,2	90,1	92,5	11	6,3

Tabla 4.31.

Comparación de las propiedades bioquímicas de las cefalosporinas de cepas agrupadas en genotipos.

Cepas	Genotipado	A. clavulánico	pendiente	Cloxacilina	pendiente	Sulbactam	pendiente	Aztreonam	pendiente	pl
44	A	15	-	93,6	2,2	83,8	1,2	93,2	<0,3	a
90	A	20	-	94	3,2	82	2,1	94	<0,3	a
32	A	11,5	-	93,4	0,5	88,4	2	93,9	<0,3	a
55	A1	10	-	90,4	0,3	91,4	0,5	91,4	<0,3	b
86	A2	18,2	-	93,4	<0,3	87,7	<0,3	92,9	<0,3	b
144	B	42,8	1,9	93,7	<0,3	90,8	<0,3	94,8	<0,3	b
50	B	8,9	-	82	2,8	80,4	4,6	88,8	<0,3	a
98	C	13,6	-	96,3	0,6	82,1	2,1	94,2	<0,3	a
107	C	12,8	-	94,4	0,4	87,2	2,4	95	<0,3	b

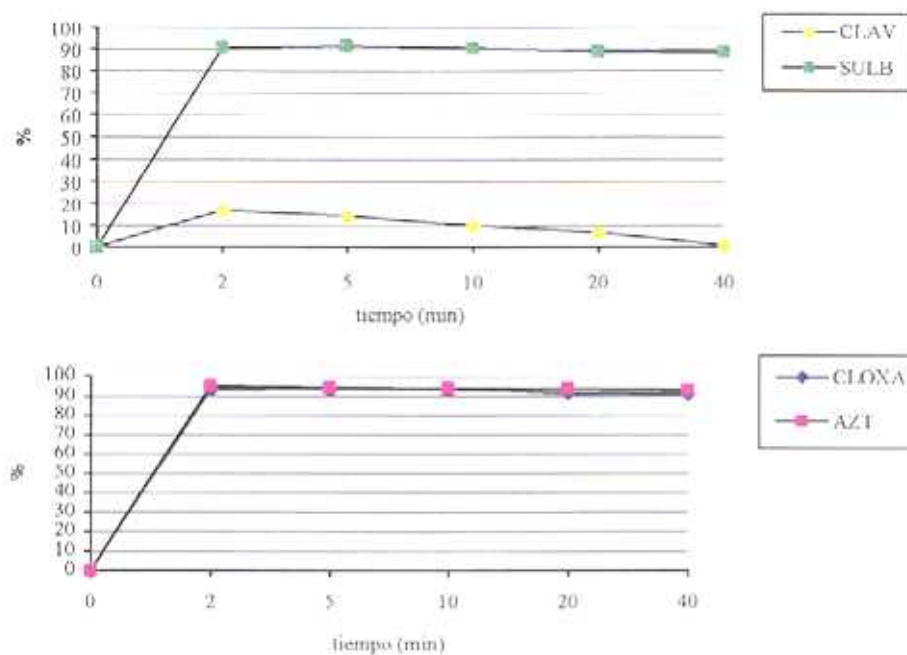
Tabla 4.32.

Comparación de las propiedades bioquímicas de las betalactamasas de cepas no agrupables.

Cepas	Genotipo	A. clavulánico	pendiente	Cloxacilina	pendiente	Sulbactam	pendiente	Aztreonam	pendiente	pl
152	Y	39	2,6	90	<0,3	92	<0,3	89	<0,3	a
155	α	45	0,5	95	<0,3	94	<0,3	95	<0,3	a
150	X	27	<0,3	89,2	<0,3	93,7	<0,3	86	<0,3	a
149	W	40	4	87	<0,3	88	<0,3	93,4	<0,3	a
28	J	45	3,2	89	0,2	92,2	0,3	89	<0,3	b
25	I	10	-	86	0,5	85	0,7	87	<0,3	b
54	\tilde{N}	3	-	91,2	<0,3	90,1	1	92,5	<0,3	a

Figura 4. XIII
Variación de la inhibición con el tiempo.

β -lactamasa cepa 86.



β -lactamasa cepa 32.

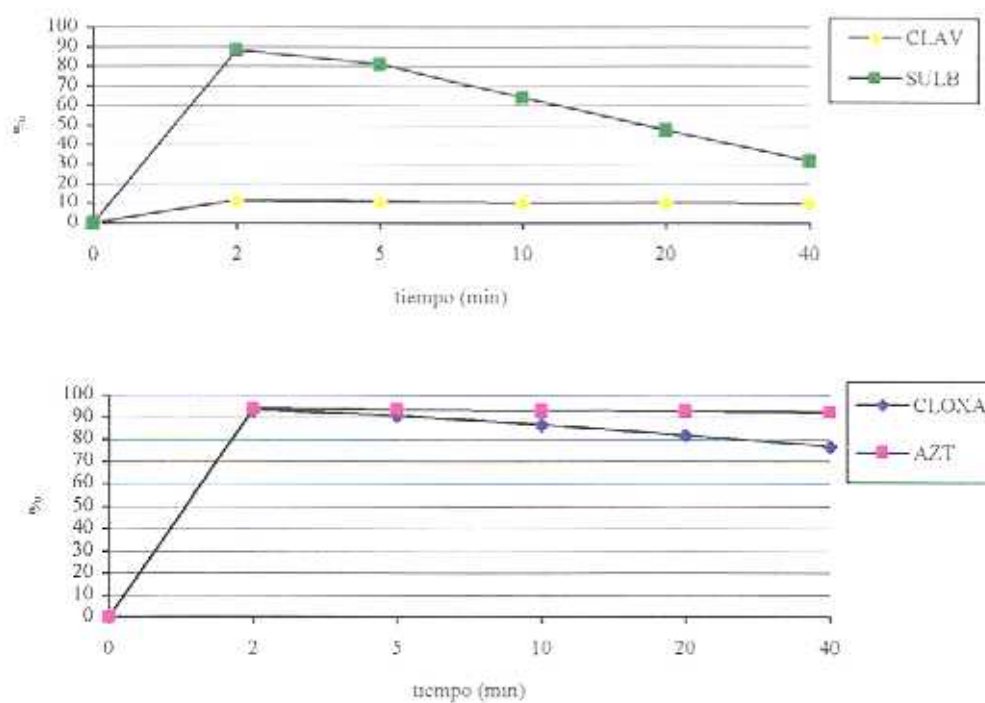
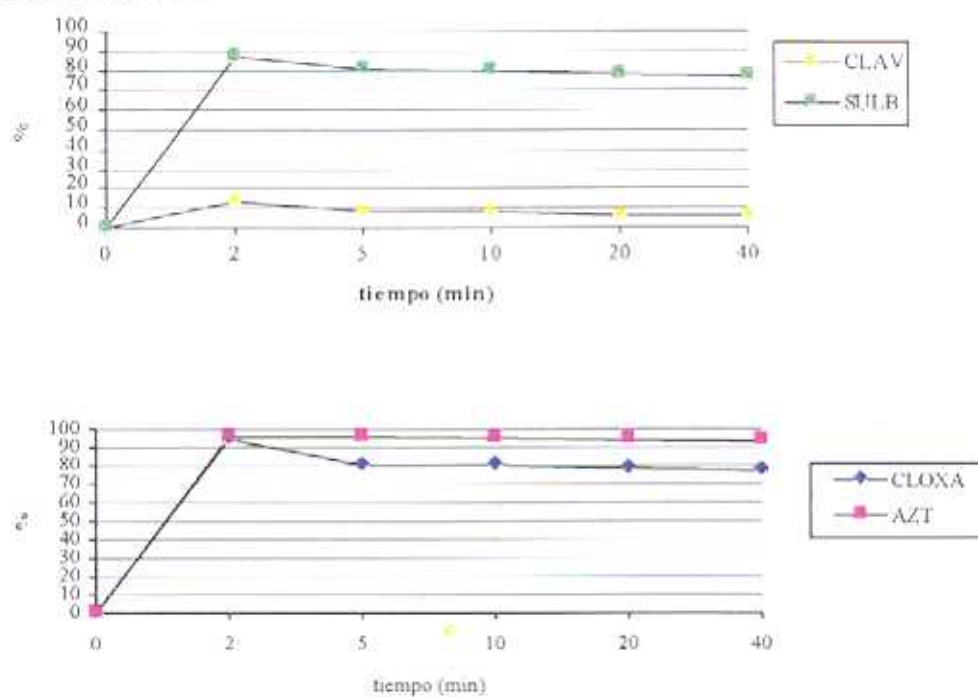
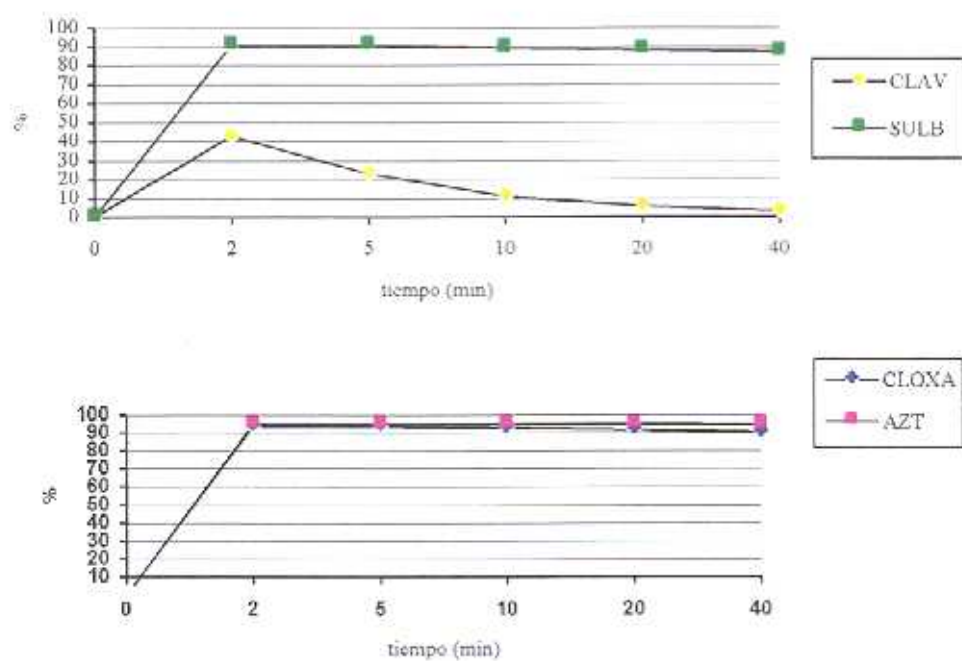


Figura 4.XIV.
Variación de la inhibición con el tiempo.

β -lactamasa cepa 107.



β -lactamasa cepa 144.



4.5.3.2.2. PERFIL DE HIDRÓLISIS.

Este estudio se realizó con los extractos enzimáticos crudos, obtenidos de los aislamientos incluidos en el estudio de determinación del perfil de inhibición.

4.5.3.2.2.2. Método microbiológico.

- Todos los extractos enzimáticos crudos que presentaban actividad cefalosporinasa mostraron hidrólisis por los siguientes antibióticos betalactámicos:

- Ampicilina, cefazolina, cefuroxima, cefotaxima.

- Ninguno de los extractos estudiados mostró hidrólisis de:

- Ceftazidima, carbenicilina, imipenem, meropenem.

Mediante estos resultados se demostró que las cepas incluidas en el estudio mostraban una clara actividad cefalosporinasa, que no afectaban apenas a las penicilinas, ni a los carbapenémicos. Los resultados de este trabajo se confirmaron con el método espectrofotométrico.

4.5.3.2.2.2. Método espectrofotométrico.

Se seleccionaron 16 cepas de las incluidas en el estudio del perfil inhibitorio cuantitativo, que correspondían a aislamientos de diferente patrón de genotipado, que a su vez presentaban diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos.

Se calculó la actividad enzimática específica (expresada en U) hacia cefaloridina (LOR) y bencilpenicilina (PEN). Al antibiótico que presentara la mayor actividad hidrolítica se le adjudicó el valor del 100%. El perfil de hidrólisis hacia el resto de antimicrobianos se expresó en porcentaje de hidrólisis con respecto al antibiótico que representaba el 100%.

Algunos extractos enzimáticos mostraron la hidrólisis hacia cefaloridina 100 μ M, mayor que hacia bencilpenicilina, por lo que se le dió a dicho antibiótico el valor del 100%. En otros extractos se utilizó una concentración superior de cefaloridina (1mM) para demostrar la actividad cefalosporinasa, ya que a concentraciones inferiores se observaba una actividad enzimática hacia bencilpenicilina superior al 100%. Dentro del grupo de cepas relacionadas genéticamente predominó este último grupo de cefalosporinasas que tenían en común el mismo tipo de pI α , sin embargo dicha relación no se pudo establecer en las cepas no relacionadas genéticamente (tablas 4.33 y 4.34).

En la tabla 4.35 se muestran los valores de actividad enzimática específica reflejados para diferentes antibióticos, expresados como porcentaje de hidrólisis respecto a la cefaloridina. Mediante este ensayo no se pudo demostrar la hidrólisis de cefotaxima, aunque sí se confirmó la ausencia de hidrólisis de ceftazidima, carbenicilina, imipenem y meropenem demostrada previamente por el método microbiológico.

Tabla 4.33.

Distribución de las cepas genéticamente relacionadas según la actividad hidrolítica de bencilpenicilina y el pI.

	100-150% hidrólisis PEN*	<100% hidrólisis PEN*
pI a (>8,5)	44, 32, 90, 50, 98	-
pI b (8-8,5)	86	55, 107, 144

* Se considera la hidrólisis de cefaloridina 100 μ M como el 100%.

Tabla 4.34.

Distribución de las cepas no relacionadas genéticamente según la actividad hidrolítica de bencilpenicilina y el pI.

	100-150% hidrólisis PEN*	<100% hidrólisis PEN*
pI a (>8,5)	149, 152	150, 155
pI b (8-8,5)	28	-

* Se considera la hidrólisis de cefaloridina 100 μ M como el 100%.

Tabla 4.35.

Perfil de hidrólisis de las cefalosporinas de *Acinetobacter* spp.

Genotipo	Perfil de resistencia	Cepa	LOR	PEN	CTX	CAZ	CARB	IMP	MEP	pl
A	I	44	100*	17,3	<0,03	<0,003	11,2	0,24	0,34	a
	III	90	100*	9,4	0,14	<0,003	<11,2	0,07	0,14	a
	IV	32	100*	6,2	0,03	0,003	<11,2	0,06	0,1	a
A1	III	55	100	31,8	3,7	1,5	<11,2	0,47	1,1	b
A2	I	86	100*	16,7	1	0,003	<11,2	3,2	2,5	b
B	III	144	100	65,3	14,6	9,2	<11,2	8	12,6	b
	IV	50	100*	12,6	2,2	0,07	<11,2	0,04	0,01	a
C	III	98	100*	15,4	0,22	0,29	<11,2	0,052	0,17	a
	IV	107	100	50	4	5	<11,2	8,7	6,2	b

* Se estudiaron a concentraciones de cefaloridina 1mM.

4.5.3.2.3. CARACTER INDUCTOR/CONSTITUTIVO DE LAS BETALACTAMASAS CROMOSÓMICAS.

Para este estudio se seleccionaron cepas que presentaran cefalosporinas cromosómicas ($\text{pI} > 8$, inhibición por sulbactam, cloxacilina pero no por ácido clavulánico), y pertenecieran a los fenotipos de resistencia I o II (sensibles a cefalosporinas de 3ª generación). Además se incluyeron algunas cepas que, aunque perteneciendo al fenotipo III, presentaban bajo nivel de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, y se consideraban sensibles por la técnica de difusión en disco. En la tabla 4.36 se representan los aislamientos elegidos, junto al valor de CMI que presentan a las cefalosporinas estudiadas.

Tabla 4.36.

Relación de cepas elegidas con sus correspondientes valores de CMI a cefalosporinas de 3ª generación.

CMI/ Cepas	4	25	28	31	44	80	84	94	147	152
CTX	16	8	16	16	8	8	8	8	64	16
CAZ	4	2	8	2	4	2	4	16	16	8

No se observó la presencia de betalactamasas inducibles por el método de sinergia en doble disco, ya que no hubo achatamiento de los halos de cefotaxima, ni tampoco por el método de incorporación de inductor al agar. Se observó sin embargo que la cepa control de inducción de betalactamasa (*Serratia marcescens*), producía un achatamiento del halo de cefotaxima ante la proximidad del halo de cefoxitina. Se confirmó la presencia de betalactamasa inducible en la cepa control por el método de incorporación de inductor al agar, ya que el halo de inhibición de cefotaxima era mayor en la placa con imipenem que en la placa sin antibiótico, a diferencia de las cepas de *Acinetobacter*, donde no se observaban diferencias en los respectivos halos de inhibición de cefotaxima (en las placas con y sin

imipenem). En la figura 4.XV se observa la ausencia de inducción de betalactamasa por el método de incorporación de inductor al agar, en un aislamiento de *Acinetobacter*, y la presencia de betalactamasas inducibles en la cepa control.

4.5.3.1.4. HIPERPRODUCCIÓN DE BETALACTAMASA CROMOSÓMICA..

Para realizar este estudio, se escogieron 23 cepas, 20 de ellas con actividad cefalosporinasa ya caracterizada y procedentes de diferentes genotipos, y el resto con diferentes betalactamasas (cepas 38 y 113, con carbapenemasas, 103 con cefalosporinasa y enzima TEM-1), que se utilizaron como controles negativos de hiperproducción de betalactamasas. Un 47,8% del total de las cepas (11/23) mostraron hiperproducción, y un 52,1% no lo mostraron. La mayoría de las cepas positivas pertenecían al perfil de resistencia tipo IV, y algunas al fenotipo III. En cualquier caso, todas las cepas presentaban resistencia a las cefalosporinas de 3º generación, generalmente de alto nivel. Únicamente 3 cepas eran sensibles a ceftazidima, aunque resistentes a cefotaxima.

Las cepas que no mostraron hiperproducción de betalactamasas, pertenecían o bien al grupo I o al grupo III o IV. En la mayoría de los casos, eran sensibles o presentaban resistencia de bajo nivel (valores de CMI intermedio), a las cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima y ceftazidima).

Únicamente 2 cepas no hiperproductoras de betalactamasas presentaron alto nivel de resistencia a ceftazidima, una de ellas era sensible a cefotaxima. Esta técnica fue negativa además en las 2 cepas portadoras de carbapenemasas (cepas 113 y 38), así como en la cepa 103 que presentaba simultáneamente 2 betalactamasas (TEM-1 y Cefalosporinasa). Estos datos se reflejan con mayor detalle en las tablas 4.37 y 4.38.

Figura 4.XV.

Prueba de la inducción de betalactamasas por el método
de incorporación de inductor al agar



A: inducción de betalactamasas en la cepa control (*Serratia marcescens*), (se observa en la placa con IMP (placa de la dcha.)).

B: ausencia de inducción de betalactamasas en una cepa de *Acinetobacter* (154).

Tabla 4.37.

Comparación de los valores de CMI a cefalosporinas de 3^a generación, en diferentes cepas que presentan hiperproducción de betalactamasas.

Cepas	90	32	55	144	98	107	77	54	149	106	116
CTX (CMI, mg/l)	128	>128	32	64	128	>128	>128	128	32	128	16
CAZ (CMI, mg/l)	16	64	8	16	32	>128	64	32	8	32	2
Fenotipo de resistencia	IVb	IVb	IIIa	IVb	IVb	IVb	IVb	IVb	IVa	IVb	IIIa
Patrón de tipado	A	A	AI	B	C	C	D	Ñ	W	S	V

Tabla 4.38.

CMI a cefalosporinas de 3^a generación, en diferentes cepas que no presentan hiperproducción de betalactamasas.

Cepas	44	86	31	150	152	154	117	155	113	38	103
CTX (CMI, mg/l)	8	8	16	16	16	16	16	32	>128	64	8
CAZ (CMI, mg/l)	4	32	2	8	8	16	4	32	>128	16	8
Fenotipo de resistencia	I	IIIb	IIIa	IVa	IIIa	IIIb	IVa	IIIb	V	V	II
Patrón de tipado	A	A2	K	X	Y	Z	E	α	A	L	CI

4.5.3.3. *Betalactamasas plasmídicas tipo TEM-1. Perfil de inhibición.*

La presencia de 2 betalactamasas simultáneamente en el mismo extracto enzimático crudo dificultó el estudio del perfil inhibitorio de manera cuantitativa. Se mostró claramente la inhibición por sulbactam y aztreonam, y no por cloxacilina. La inhibición por ácido clavulánico, en torno al 60%, y la clara inhibición por aztreonam impidió demostrar la actividad única de enzima tipo TEM-1, por lo que se corroboró la presencia de una enzima cefalosporinasa cromosómica unida a la anterior.

En la tabla 4.39 se pueden observar los valores de máximo porcentaje de inhibición por los inhibidores estudiados.

Tabla 4.39.

Máximo porcentaje de inhibición del extracto 103 (TEM-1 + Csa).

Ac. clavulánico	Cloxacilina	Sulbactam	Aztreonam	CINa	EDTA
65	0	89	84	35	53

4.5.3.4. *Nuevas betalactamasas.*

Dada la importancia de ciertas betalactamasas en cepas resistentes a carbapenémicos, y ya que por los estudios de caracterización preliminar no se logró encuadrarlas en ningún esquema de clasificación, se procedió a una caracterización más específica de las mismas. Para ello se seleccionó uno de los extractos que presentaba pI de 7,7 (cepa 113), y de igual modo se estudió el extracto con pI 6,8-7 (cepa 38).

4.5.3.4.1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL PERFIL DE INHIBICIÓN.

• Se determinó el perfil inhibitorio a ácido clavulánico, sulbactam, cloxacilina y aztreonam. La máxima inhibición de todos los antibióticos estudiados en ambos extractos se observó a los 2 min. Según los porcentajes de máxima inhibición no se apreció una clara inhibición por ácido clavulánico, cloxacilina, sulbactam, ni por aztreonam. Estos resultados quedan expuestos en la tabla 4.40.

Tabla 4.40.

Máximo porcentaje de inhibición de las nuevas betalactamasas.

β -lactamasas(cepas)	A. clavulánico	Cloxacilina	Sulbactam	Aztreonam
113	7	10,1	14,8	9,5
38	3	16,7	14	12,4

• En el estudio de inhibición por EDTA, se descartó la posibilidad de que ninguno de los extractos, ni el 113, ni el 38 correspondieran a “metalo-enzimas” (Tabla 4.41).

• Por otro lado no se observó la inhibición de ninguna de las betalactamasas por ClNa a las concentraciones estudiadas. (Tabla 4.41).

Tabla 4.41.

Máximo porcentaje de inhibición de las nuevas betalactamasas.

β -lactamasas(cepas)	ClNa	EDTA
113	13,8	13,2
38	14,5	12

4.5.3.4.2. PERFIL DE HIDRÓLISIS.

4.5.3.4.2.1. Método microbiológico.

• El extracto enzimático, utilizado crudo y a diversas diluciones, que correspondía a la cepa 38, con pI de 6,8-7 hidrolizó los siguientes antibióticos:

- Ampicilina, cefazolina, oxacilina, carbenicilina, imipenem y meropenem.
- No se observó claramente la hidrólisis de cefuroxima.
- No se observó la hidrólisis de cefotaxima y ceftazidima.

Ante estos resultados se pudo afirmar que esta betalactamasa presentaba actividad carbapenemasa, debido a la hidrólisis de imipenem y meropenem, probablemente penicilinas, ya que hidrolizaba a las penicilinas y apenas afectaba las cefalosporinas.

• De igual modo, se estudió la hidrólisis enzimática que presentaba el extracto enzimático de la cepa 113 crudo, y a diversas diluciones, observándose una clara hidrólisis de todos los betalactámicos incluidos en el estudio, excepto en el caso de ceftazidima, donde la hidrólisis no fue muy clara.

Por tanto se pudo afirmar que esta betalactamasa era una carbapenemasa, afectando a ambos carbapenémicos, con clara actividad penicilinas, que además hidrolizaba la carbenicilina, y oxacilina, pero que también afectaba a las cefalosporinas de 1ª, 2ª y a algunas de 3ª generación. En la figura 4.XVI se muestran los resultados de la hidrólisis de imipenem de estas nuevas betalactamasas (cepas 38 y 113) mediante el método microbiológico.

Los resultados del perfil de hidrólisis realizados mediante el método microbiológico se comprobaron mediante la utilización de técnicas espectrofotométricas.

Figura 4.XVI.

Hidrólisis de IMP por las nuevas betalactamasas mediante el método microbiológico.

A**B**

Hidrólisis de IMP a diferentes diluciones de extracto enzimático (A: cepa 38; B: cepa 113).

4.5.3.4.2.2. Método espectrofotométrico.

Para este estudio se utilizaron los extractos enzimáticos crudos. Se puede observar en la tabla 4.42 como en ambos extractos enzimáticos (113 y 38) predomina la actividad penicilinasa, por lo que la actividad hidrolítica hacia el resto de antibióticos se expresa en porcentajes de actividad con respecto a bencilpenicilina (hidrólisis 100%).

En el extracto 113 se observa una elevada actividad hidrolítica hacia carbenicilina, tal y como se había demostrado mediante el método microbiológico, sin embargo la actividad mostrada por este método hacia oxacilina, cefotaxima, imipenem y meropenem no se observa mediante el estudio espectrofotométrico. El ensayo microbiológico fue suficiente para afirmar que se trataba de una carbapenemasa tipo penicilinasa, con actividad hacia carbenicilina y oxacilina fundamentalmente, que además afectaba a las cefalosporinas.

En el extracto 38 únicamente se muestra, mediante el método espectrofotométrico la actividad hidrolítica hacia penicilina. La actividad hidrolítica hacia el resto de antibióticos estudiados no se pudo comprobar por este método. No obstante con los estudios realizados por el ensayo microbiológico se pudo afirmar que se trataba de una carbapenemasa de tipo penicilinasa que afecta ligeramente a oxacilina y carbenicilina, y con escasa actividad frente a cefalosporinas.

Tabla 4.42.

Perfil de hidrólisis de las betalactamasas de *Acinetobacter* spp.

Genotipo	Perfil de resistencia	Cepa	PEN	LOR	CTX	CAZ
A	V	113	100	8,5	0,33	0,8
X	V	38	100	4,9	57,5	0,47

Tabla 4.43.

Perfil de hidrólisis de las betalactamasas de *Acinetobacter* spp.

Genotipo	Perfil de resistencia	Cepa	CARB	OXA	IMP	MEP
A	V	113	146	<1	0,59	0,73
X	V	38	<1	<1	1	0,16

4.5.3.4.3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS BETALACTAMASAS:

ESTUDIO DE PLÁSMIDOS DE RESISTENCIA.

Se estudió la presencia de plásmidos en ambas cepas, con el fin de curarlos posteriormente, y determinar si éstos afectaban o no a la resistencia antimicrobiana, principalmente a los carbapenémicos.

Se observó la presencia de un plásmido de >40 mD en la cepa 113. En la cepa 38, se observaron 2 plásmidos. (Figura 4.XVII).

Tras el tratamiento del cultivo de las cepas con bromuro de etidio, se logró eliminar el plásmido de la cepa 113. Sin embargo la cepa 38 no se pudo curar.

Los siguientes estudios permitieron comprobar la implicación de dicho plásmido en la resistencia antibiótica:

- Se observó que la CMI a imipenem, meropenem, cefotaxima y ceftazidima había disminuido claramente en la cepa curada respecto de la original. (Tabla 4.43). No se observó disminución de la CMI a ticarcilina.

- Se observó la ausencia de bandas de pI en el extracto enzimático puro, obtenido por sonicación de la cepa curada.

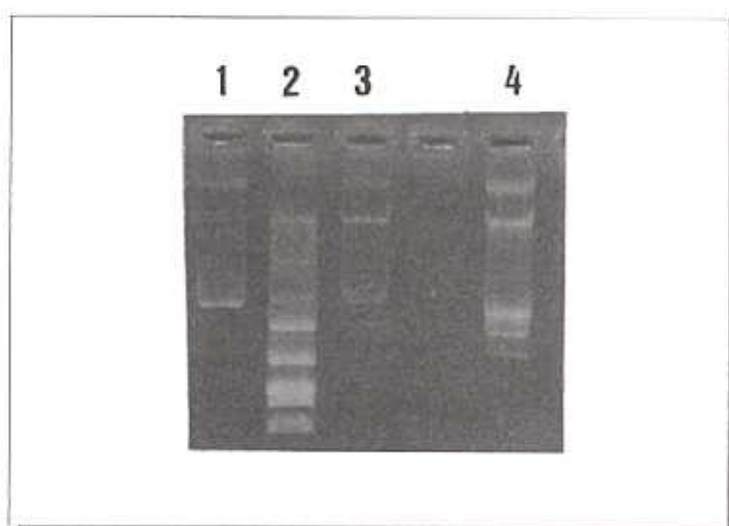
Tabla 4.44.

Relación de la CMI de la cepa portadora de carbapenemasa y cepa curada respectivamente.

Extracto/ATB	IMP	MEP	CTX	CAZ	TIC
113	>128	128	>128	>128	>1024
113-c	16	8	64	16	>1024

Figura 4.XVII.

Perfil plasmidico de cepas de *Acinetobacter baumannii* productoras de carbapenemasas.



Línea 1: *E. coli* I145; línea 2: *E. coli* I148; línea 3: *A. baumannii*.cepa 38; línea 4: *A. baumannii* cepa 113,

4.6. ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA.

4.6.1. Optimización de la concentración de proteínas.

Para conseguir la concentración de proteínas más adecuada para el estudio del perfil de OMPs, se realizó la electroforesis SDS-PAGE con 4 muestras, empleando 4 concentraciones diferentes de cada una de ellas (1, 2, 5 y 10 μg). De las 4 concentraciones diferentes estudiadas se observó que la concentración de 5 μg era la que permitía una mejor visualización del perfil de OMPs, tanto de las OMPs principales como de las minoritarias. De este modo se podría comparar la posible disminución o ausencia en algunas de ellas. En las figuras 4.XVIII-A y XVIII-B se observan los perfiles de OMPs obtenidos a las concentraciones de 1, 2, 5 y 1, 5, y 10 μg respectivamente, de las 4 muestras estudiadas. En todos los casos se observa que la concentración de 5 μg es la que permite una mejor visualización del patrón de OMPs.

4.6.2. Alteración de las OMPs como posible mecanismo de resistencia.

El análisis de las proteínas de membrana externa (OMPs) de *Acinetobacter* mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró un perfil de OMPs muy similar en todos los aislamientos estudiados.

La presencia de 3 OMPs principales se observó en la mayoría de las cepas, con pesos moleculares aparentes de 42, 27 y 17 kD.

Al comparar cepas con diferentes perfiles de resistencia dentro de cada genotipo no se observó disminución o ausencia de ninguna de las OMPs principales.

Igualmente se compararon varias cepas resistentes a carbapenémicos con otras pertenecientes al mismo genotipo pero sensibles a estos antimicrobianos, y a su vez con diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos. No se observó ausencia de ninguna de las OMPs principales ni disminución de la intensidad de las mismas, siendo los perfiles de proteínas iguales. Tampoco se observaron diferencias en los perfiles de OMPs al comparar la cepa resistente a imipenem con su correspondiente cepa curada.

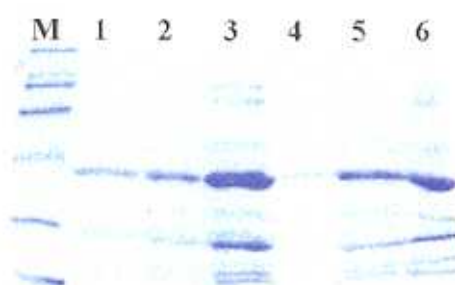
En las figuras 4.XIX-A a 4.XIX-D se observan comparativamente los perfiles de OMPs en las diferentes cepas estudiadas.

Los resultados de este estudio demuestran por tanto que a pesar de la elevada resistencia antimicrobiana en *Acinetobacter* la alteración en la permeabilidad de la membrana externa no parece estar implicación en los mecanismos de resistencia a betalactámicos, incluidos los carbapenémicos.

Figura 4 XVIII

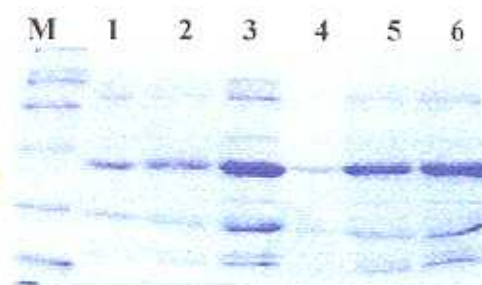
Comparación de los perfiles de OMPs obtenidos en *Acinetobacter* a diferentes concentraciones de proteína.

Figura 4 XVIII-A



M: marcador de peso molecular; líneas 1 y 4: concentración de proteínas de 1 μ g; línea 2: 2 μ g; líneas 3 y 5: 5 μ g; línea 6: 10 μ g.

Figura 4 XVIII-B

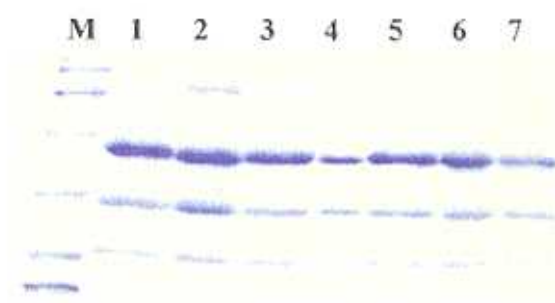


M: marcador de peso molecular; líneas 1 y 4: concentración de proteínas de 1 μ g; línea 2: 2 μ g; líneas 3 y 5: 5 μ g; línea 6: 10 μ g.

Figura 4.XIX.

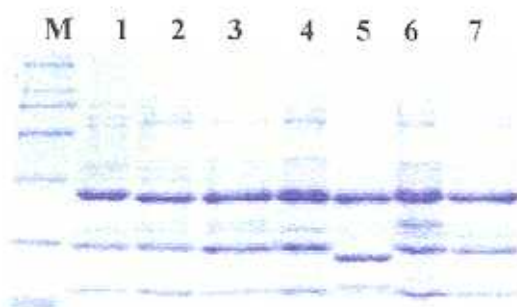
Comparación de los perfiles de OMPs obtenidos en diferentes aislamientos clínicos de *Acinetobacter*.

Figura 4.XIX-A.



M: marcador de peso molecular; líneas 1 y 2: genotipo A con diferentes niveles de resistencia; líneas 3, 4, 5, 6 y 7: genotipo B.

Figura 4.XIX-B.

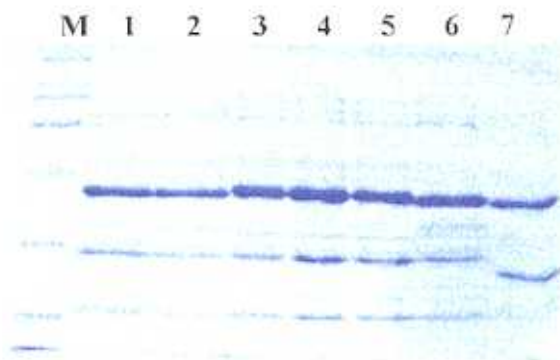


M: marcador de peso molecular; líneas 1 y 4: genotipo A, línea 2 y 3: genotipo B; líneas 5, 6 y 7: diferentes genotipos.

Figura 4.XIX.

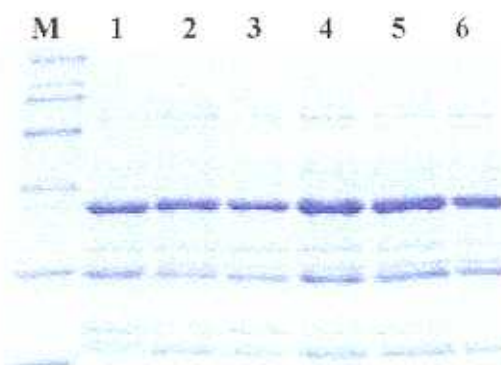
Comparación de perfiles de OMPs obtenidos en diferentes aislamientos clínicos de *Acinetobacter*

Figura 4.XIX-C.



M: marcador de peso molecular; líneas 1, 2 y 3: genotipo A con diferentes niveles de resistencia; líneas 4 y 5: genotipo B; líneas 6 y 7: diferentes genotipos.

Figura 4.XIX-D.



M: marcador de peso molecular; línea 1: genotipo A, cepa curada de la resistencia a carbapanémicos; línea 2: genotipo A, cepa resistente a carbapanémicos; línea 3: diferente genotipo, cepa resistente a carbapanémicos; líneas 4, 5 y 6: genotipo B.

4.7. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO DE RESISTENCIA Y LA PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASAS EN *ACINETOBACTER*.

El estudio del fenotipo de resistencia a betalactámicos se estableció siguiendo las normas del NCCLS de 1998 (criterio A) y comparativamente según el NCCLS de 1997 (criterio B). En las tablas 4.45, 4.46, 4.47 y 4.48 se muestra la relación entre el fenotipo de resistencia a betalactámicos (criterios A y B respectivamente) y la producción de betalactamasas en el total de los aislamientos de *Acinetobacter* incluidos en el estudio.

El predominio de cepas resistentes (Grupos III/IV dependiendo del criterio aplicado) se relacionó con la elevada producción de betalactamasas.

Se observó una mayor relación en cuanto a la producción de Csas y cepas del Grupo III, y en cuanto a la presencia de enzimas tipo TEM-1 en las cepas del Grupo II, al aplicar el criterio B (NCCLS 1997).

Tabla 4.45.

Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en *Acinetobacter* (criterio A).

PATRON FENOTÍPICO	Nº	βL (+)	βL (-)
Grupo I (TIC ^S PIP ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	10	4	6
Grupo II (TIC ^R PIP ^R CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	2	1	1
Grupo III (TIC ^S PIP ^V CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	20	19	1
Grupo IV (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	107	106	1
Grupo V (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^R IMP ^R)	17	17	0
TOTAL	156	145	11

Tabla 4.46.

Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en *Acinetobacter* (criterio B).

PATRON FENOTÍPICO	Nº	βL (+)	βL (-)
Grupo I (TIC ^S PIP ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	11	4	7
Grupo II (TIC ^R PIP ^R CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	1	1	0
Grupo III (TIC ^S PIP ^V CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	86	83	3
Grupo IV (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	41	40	1
Grupo V (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^R IMP ^R)	17	17	0
TOTAL	156	145	11

Tabla 4.47.

Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en *Acinetobacter* (criterio A).

PATRON FENOTÍPICO	N°	Csas	TEM+Csas	Cpsas	βL (-)
Grupo I (TIC ^S PIP ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	10	4	0	0	6
Grupo II (TIC ^R PIP ^R CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	2	0	1	0	1
Grupo III (TIC ^S PIP ^V CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	20	19	0	0	1
Grupo IV (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	107	106	0	0	1
Grupo V (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^R IMP ^R)	17	0	0	17	0
TOTAL	156	129	1	17	9

Tabla 4.48.

Patrón fenotípico de resistencia y betalactamasas en *Acinetobacter* (criterio B).

PATRON FENOTÍPICO	N°	Csas	TEM+Csas	Cpsas	βL (-)
Grupo I (TIC ^S PIP ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	11	4	0	0	7
Grupo II (TIC ^R PIP ^R CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	1	0	1	0	0
Grupo III (TIC ^S PIP ^V CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	86	83	0	0	3
Grupo IV (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^V IMP ^S)	41	40	0	0	1
Grupo V (TIC ^R PIP ^R CTX ^R CAZ ^R IMP ^R)	17	17	0	17	0
TOTAL	156	127	1	17	11

4.8. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA ENTRE LAS CEPAS GENÉTICAMENTE RELACIONADAS Y DE APARICIÓN ESPORÁDICA.

4.8.1. Sensibilidad antimicrobiana en los diferentes genotipos de *Acinetobacter*.

La comparación de la sensibilidad antimicrobiana en los diferentes genotipos establecidos por rep-PCR (A, B y C) con el resto de aislamientos no relacionados genéticamente se muestra en las figuras 4.XXy 4.XXI.

El grupo de cepas esporádicas presenta en general una mayor sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, sin embargo los grupos A, B y C muestran mayor resistencia a todos los antimicrobianos. Se observa que de estos grupos el genotipo A es el que presenta menores porcentajes de sensibilidad, destacando especialmente la menor sensibilidad a los carbapenémicos, a diferencia de otros grupos que permanecen sensibles al 100%.

De igual modo se observa, independientemente del criterio aplicado, una mayor relación de las cepas de los grupos A, B y C con los fenotipos III/IV, y V (en este último caso para el genotipo A) y de las cepas no relacionadas genotípicamente con el Grupo I (figura 4.XXII).

4.8.2. Distribución de las betalactamasas en los diferentes genotipos.

La producción de betalactamasas predominó en las cepas agrupadas en diferentes genotipos. Dentro de éstas el genotipo A, que era el más resistente, presentaba dos tipos de betalactamasas, cefalosporinasas cromosómicas del grupo 1 (Csas) y una nueva betalactamasa de tipo carbapenemasa (Cpsas). Dentro de las cefalosporinasas

cromosómicas cabe destacar el predominio de betalactamasas con pI α , a diferencia de aquéllas con pI b , que predominan en el genotipo B. Estos datos quedan reflejados en la figura 4.XXIII.

Figura 4.XX.

Porcentajes de sensibilidad a antibióticos betalactámicos en los diferentes genotipos.

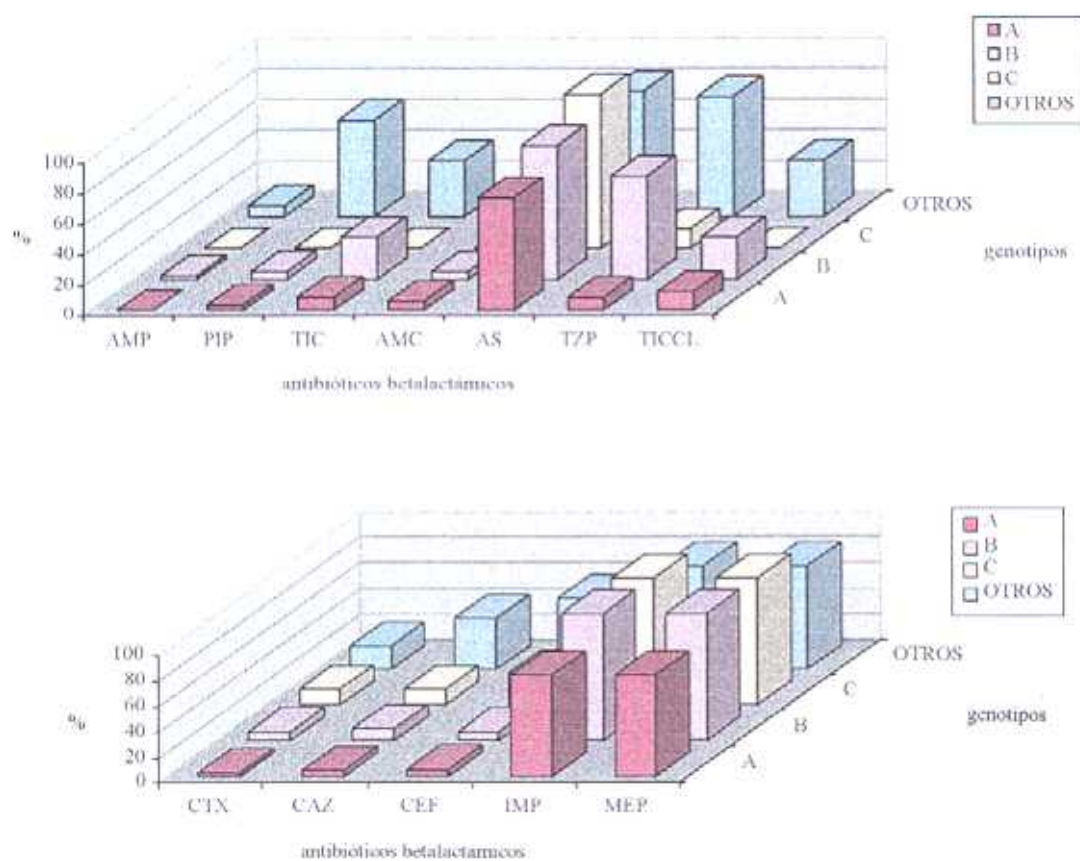


Figura 4.XXI.

Porcentajes de sensibilidad antibióticos no betalactámicos en los diferentes genotipos.

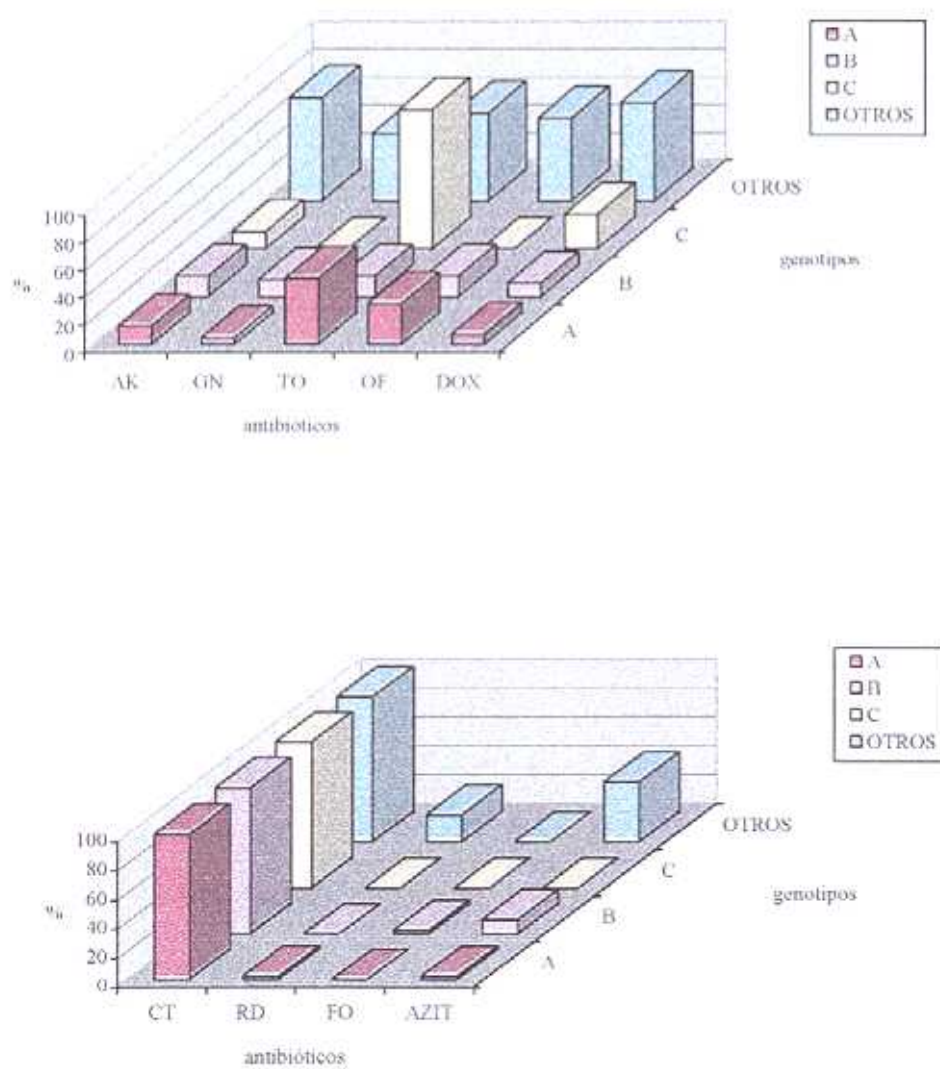


Figura 4 XXII

Distribución de los genotipos de *Acinetobacter* según el patrón de resistencia a betalactámicos (criterios A y B respectivamente).

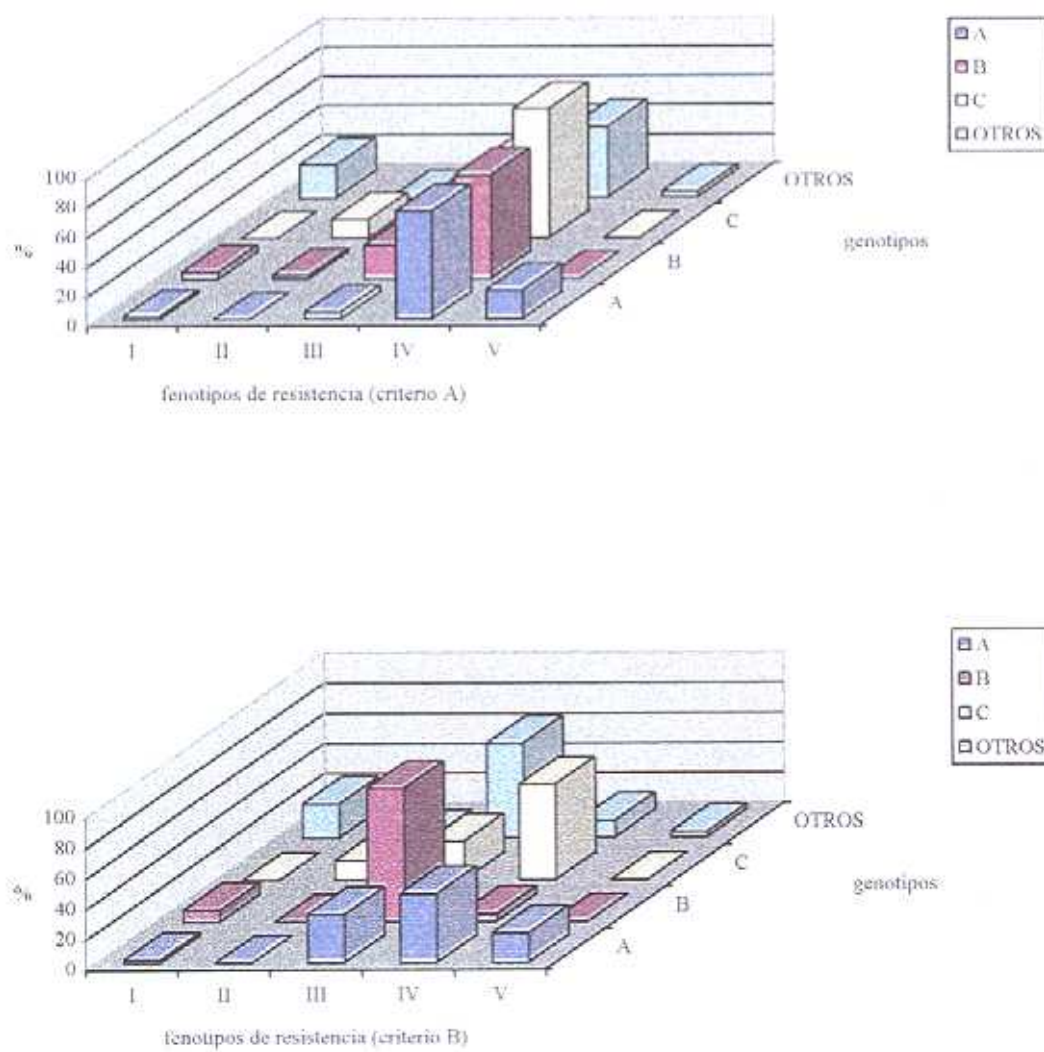
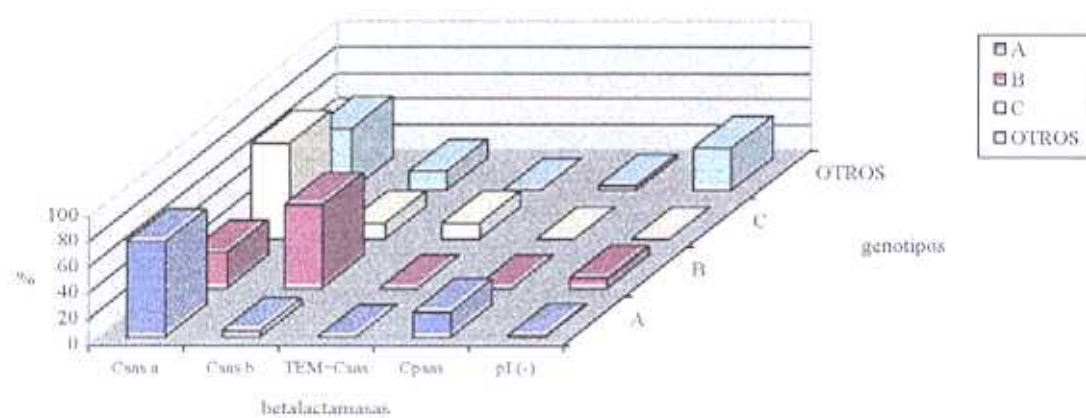


Figura 4.XXIII.

Distribución de las betalactamasas de *Acinetobacter* en los diferentes genotipos.



5. DISCUSIÓN.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

La identificación correcta de *Acinetobacter* a nivel de especie requiere la utilización de técnicas basadas en el análisis del ADN. Dada la complejidad de las mismas, la mayoría de los laboratorios suelen emplear otros métodos más sencillos, como son aquéllos basados en la asimilación de fuentes de carbono. El sistema comercial API 20 NE destaca por su gran simplicidad y aplicabilidad en la práctica diaria. En su última versión se incluyen las especies descritas recientemente con nombre específico, excepto *A. radioresistens*. Sin embargo otras especies sin nombre propio, como las genopecies 3 y 13, muy comunes en el ambiente hospitalario no se pueden identificar mediante este sistema. Aunque su aplicación está más recomendada para la identificación a nivel de género, se ha demostrado que el sistema API 20 NE permite identificar correctamente las cepas de *A. baumannii* y *A. haemolyticus*, sin embargo no discrimina entre las genopecies 1, 2, 3 y 13TU (Bernards, 1996).

En nuestro trabajo se identificaron todos los aislamientos como *A. baumannii* por el sistema API 20 NE, sin embargo no todos presentaban el mismo porcentaje de pruebas bioquímicas positivas.

El estudio del crecimiento a diversas temperaturas (30°C, 37°C y 44°C), así como la producción de hemólisis permitió una mejor discriminación entre las diferentes especies. Muchos autores admiten que *A. baumannii* es la única especie capaz de crecer a 44°C, sin embargo estudios posteriores han comprobado cómo otros aislamientos, pertenecientes al complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, también pueden sobrevivir a dicha temperatura, dependiendo del medio empleado (Gerner-Smidt, 1994). Tal es el caso de las genopecies 3 y 13.

Aunque la identificación definitiva a nivel de especie requiere la utilización de pruebas genotípicas más complejas, el crecimiento a 30°C, 37°C y 44°C, junto con la identificación por API 20 NE, permitió identificar todos los aislamientos del estudio como *A. baumannii*, al menos como identificación presuntiva a nivel de especie.

5.2. TIPADO DE LOS MICROORGANISMOS.

Los microorganismos del género *Acinetobacter* han pasado en los últimos 20 años, de ser una especie considerada inocua y aislarse del medio ambiente a comportarse como uno de los microorganismos aislados con más frecuencia en las infecciones de adquisición hospitalaria, afectando sobre todo a pacientes ingresados en UCI. Numerosos estudios indican la aparición de *Acinetobacter* en estas unidades. Este problema, junto con el de la multirresistencia que presenta dicho microorganismo supone una alarma para el clínico a la hora de controlar este tipo de infecciones. Se han desarrollado diversas técnicas de tipado para diferenciar las cepas epidémicas y establecer al mismo tiempo, su relación epidemiológica con las cepas encontradas en el ambiente hospitalario (Bergogne-Bérézin, 1991). Dado que no existe una técnica exclusiva para el tipado de *Acinetobacter* muchos autores recomiendan emplear varios métodos conjuntamente, teniendo en cuenta que los resultados presentados varían según el método utilizado y según el laboratorio en que se realicen.

En este estudio se emplearon 3 métodos fenotípicos y un método genotípico, basado en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), como es la rep-PCR. Los métodos genotípicos en general son útiles a la hora de confirmar la relación epidemiológica entre cepas, considerándose en la mayoría de los casos como el método de referencia. Se han empleado diferentes técnicas genotípicas, entre otras la rep-PCR.

Reboli (1994) utilizó conjuntamente la ERIC-PCR, la rep-PCR y otros métodos fenotípicos, consiguiendo diferenciar entre cepas epidémicas y cepas de aparición esporádica, únicamente mediante la rep-PCR. Vila (1996) logró tipar 26 aislamientos del complejo *A. calcoaceticus-baumannii*, obteniendo los mejores resultados con la rep-

PCR frente a ERIC-PCR, y otras técnicas genotípicas como el ARDRA, y la amplificación de la región 23s del *spacer*. Los resultados de reproductibilidad y poder discriminatorio obtenidos por muchos autores, así como la simplicidad de este método hacen destacar a la rep-PCR frente a otras técnicas genotípicas a la hora de estudiar brotes nosocomiales por *Acinetobacter*.

El análisis de este estudio muestra que mediante la rep-PCR se obtuvieron principalmente 3 tipos (A, B, C), con sus correspondientes subtipos, donde se agruparon la mayoría de los aislamientos. El grupo A fue el predominante con 81 cepas, seguido del grupo B con 40 aislamientos y únicamente 8 cepas se agruparon en el tipo C. Los 27 aislamientos restantes quedaron sin agrupar puesto que mostraron un perfil diferente entre sí.

Los resultados expuestos en las tablas 4.8 a 4.13 del apartado de comparación de métodos de tipado muestran en general una buena correlación entre la rep-PCR y los diferentes métodos fenotípicos empleados.

El biotipado de Bouvet y Grimont es un método fenotípico barato, fácil de realizar, y útil en estudios epidemiológicos, especialmente en estudios preliminares de tipado de cepas (Aubert, 1995). Mediante la aplicación de este método se establecieron un total de 11 biotipos, de los cuales 3 fueron predominantes. El biotipo 1 incluía a la mayoría de aislamientos (99), y fue seguido en menor porcentaje de los biotipos 8 y 9 (18,5 y 3,8% respectivamente). A pesar de obtenerse gran variedad de tipos, 3 de los biotipos fueron mayoritarios, donde uno de ellos fue el predominante, de manera muy similar a la rep-PCR. Se destaca, de igual modo cómo el resto de cepas correspondían a tipos únicos no agrupables entre sí.

Marques (1997) consideró que el biotipado era una técnica menos fiable que los métodos genotípicos a la hora de distinguir entre cepas implicadas en brotes y cepas no relacionadas. Sin embargo otros autores han obtenido una gran correlación entre el biotipado de Bouvet y Grimont y la rep-PCR. Este sistema basado en la asimilación de 5 fuentes de carbono, permite tipar únicamente las cepas que pertenecen al *complejo A. calcoaceticus-baumannii*, por lo que fácilmente pudimos aplicar esta técnica para el tipado de nuestros aislamientos.

Con respecto al sistema API 20 NE Towner y Chopade (1987) consideraron que sería un buen método de tipado ya que encontraron gran diversidad de patrones en los 122 aislamientos estudiados, observando por otro lado un menor poder discriminatorio en el grupo de aislamientos incluidos en el fenotipo *A. anitratus* (actualmente complejo *A. calcoaceticus-baumannii*) respecto a *A. hwoffii* y *A. haemolyticus*. En este trabajo hay que tener en cuenta el elevado porcentaje de aislamientos que quedaron incluidos en un mismo biotipo API, a pesar de obtenerse 14 biotipos diferentes. Marcos y col. (1994) hallaron sólo 3 biotipos API en 54 aislamientos no relacionados epidemiológicamente. El hecho de que la mayoría de los aislamientos se hayan incluido en un patrón mayoritario, permite que estos resultados se correlacionen totalmente con la rep-PCR y con el biotipado de Bouvet y Grimont.

El estudio de los patrones de proteínas de membrana externa (OMPs) obtenidos por SDS-PAGE mostró cómo 12 de las 20 cepas no agrupables por rep-PCR proporcionaron diferentes patrones. El resto de cepas incluidas en este estudio mostraron un patrón único, que al compararlo con la rep-PCR y demás métodos fenotípicos no diferenciaba a los 3 tipos definidos en los métodos anteriores. Dijkshoorn y col. (1987a, 1987b) han obtenido en diversas ocasiones buenos resultados a la hora de diferenciar

cepas productoras de brotes nosocomiales. Sin embargo en este trabajo el estudio de OMPs no se puede considerar una técnica muy válida para diferenciar entre cepas genéticamente diferentes.

La buena correlación entre la mayoría de los métodos fenotípicos empleados con respecto a la rep-PCR, y considerando que esta técnica se utiliza con gran frecuencia en la mayoría de los laboratorios como método de referencia, nos permite utilizarla como tal. Aunque no se disponga de datos epidemiológicos que puedan establecer la presencia de un brote, a partir de los resultados obtenidos mediante rep-PCR se podrán establecer los distintos grupos relacionados genéticamente entre sí, y así comparar sus mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos, con los de las cepas no relacionadas entre sí y consideradas de aparición esporádica.

5.3. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La sensibilidad antimicrobiana en *Acinetobacter* ha experimentado grandes cambios en las últimas décadas. El distinto uso de los antimicrobianos es probablemente la causa de que existan diferencias en la sensibilidad antibiótica entre diferentes países y entre diferentes hospitales. En Alemania se hace referencia a una mayor sensibilidad a aminoglicósidos, a diferencia de la mayoría de estudios en los que la resistencia a gentamicina y tobramicina es de un 50 a 80% (Seifert, 1993). En Francia, igualmente se ha observado un aumento de la resistencia a fluorquinolonas, de un 75 a un 80% en el caso de pefloxacino y otras fluorquinolonas, 5 años después de la introducción de estos antibióticos (Bergogne-Bérézin, 1996).

Vila y col. realizaron en 1993 un estudio de actividad antimicrobiana sobre 54 aislamientos, de los cuales más del 50% fueron resistentes a piperacilina, cefotaxima, ticarcilina y ceftazidima, y obtuvieron los mejores resultados con imipenem (actividad del 100%), amicacina y ofloxacino (72%) y ciprofloxacino (70%).

En el Hospital de la Princesa se ha podido observar, a lo largo de los años la evolución progresiva de la resistencia a antibióticos como ofloxacino, ceftazidima, ticarcilina y piperacilina-tazobactam (García-Arata, 1996). Comparando los resultados de sensibilidad obtenidos en nuestro trabajo, que corresponden a los años más recientes (1995-1997), con los obtenidos en años anteriores (1990-1994), se puede observar que son bastante similares, aunque con valores de CMI algo superiores en nuestro caso. De la misma forma en comparación con otros autores encontramos diferencias en la sensibilidad a ceftazidima, frente a la cual se observa un 15% de sensibilidad y otros hospitales muestran un 56-85% (Seifert, 1993; Gómez-Garcés, 1992; Reina, 1991; Visalli, 1997). Del mismo modo

hay variaciones en la sensibilidad a ticarcilina. En este trabajo se observa un 20% de sensibilidad a ticarcilina, Gómez-Garcés y col. (1992) muestran un 33% de sensibilidad; sin embargo Reina y col. (1991) cuentan con un porcentaje de sensibilidad superior al 80%. Antibióticos como imipenem, meropenem y ampicilina-sulbactam mantienen su actividad (García-Arata, 1996). En general, la buena actividad de los carbapenémicos frente a *Acinetobacter* se mantiene y coincide con la de numerosos estudios de sensibilidad descritos anteriormente (Seifert, 1993; Visalli, 1997; Alphonsus, 1994). Sin embargo actualmente se han encontrado cepas resistentes a carbapenémicos en nuestro hospital (López-Hernández, 1998), ya que en los 2 últimos años se ha producido la aparición de aislamientos resistentes a estos antimicrobianos, como podemos observar en la figura 4.VI del apartado 4.3.2 de resultados.

La elevada sensibilidad de ampicilina-sulbactam se mantiene e incluso aumenta cada año. Douboyas y col. en 1994 estudiaron la actividad *in vitro* de este antimicrobiano frente a cepas de *Acinetobacter* multirresistentes y encontraron un 70% de sensibilidad. Esto parece ser debido a la actividad intrínseca *in vitro* de sulbactam que, además de ser inhibidor suicida, se une a las PBPs de estos microorganismos (Urban, 1993; Traub, 1989; Retsema, 1986; Kazmierczak, 1989). Villar y col. (1996) han demostrado recientemente la actividad bactericida *in vitro* de sulbactam frente a cepas del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii*. La utilización de sulbactam como agente único se está incrementando cada vez más, ya que actualmente está comercializado. No es el caso de otros inhibidores de betalactamasas, como ácido clavulánico y tazobactam, que a pesar de que ciertos estudios indiquen su actividad intrínseca frente a bacterias gramnegativas (Eliopoulos, 1989; Urban, 1991), los valores de CMI observados normalmente en *Acinetobacter* no permiten su uso como

antimicrobiano (Visalli, 1996). De igual modo en el presente estudio se observan elevados valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para ambos inhibidores.

La elevada resistencia que presenta *Acinetobacter* hacia la mayoría de los antibióticos ha originado la búsqueda de nuevos fármacos, capaces de tratar infecciones por *Acinetobacter* multirresistentes, incluso en aquellos casos en los que las polimixinas permanecen como único agente activo. En este trabajo se mantiene el 100% de sensibilidad hacia colistina, sin embargo no está muy recomendado como agente sistémico, debido a su gran toxicidad. Únicamente su uso debería estar limitado a aquellos pacientes con infecciones por *Acinetobacter* multirresistente, en los que otros antibióticos menos tóxicos resultaran ineficaces (Hogg, 1998).

Otros antibióticos como rifampicina y azitromicina, eficaces en infecciones por grampositivos y por algunos gramnegativos se han estudiado en las infecciones por *Acinetobacter* como una nueva posibilidad terapéutica, utilizándolos solos o asociados a otros antimicrobianos. Azitromicina mostró en este trabajo unos valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ elevados, sin embargo en otros estudios en los que se observaron concentraciones similares se demostró su actividad bactericida cuando se asoció a otros antibióticos (Citron, 1998).

Se ha demostrado que rifampicina, combinada con otros antibióticos como colistina puede mostrar sinergia frente a bacterias gramnegativas (Hogg, 1998), incluso cuando los valores de CMI a rifampicina superen el punto de corte de sensibilidad para este antibiótico. Otras combinaciones como la asociación de rifampicina con imipenem o con ampicilina/sulbactam también han mostrado sinergia (Wolff, 1997; Tascini, 1998). El uso de estas “nuevas combinaciones” debería quedar para tratar infecciones por *Acinetobacter* en las que no queden más opciones terapéuticas.

5.4. ESTUDIO DE BETALACTAMASAS.

5.4.1. Producción y distribución de las betalactamasas en *Acinetobacter*

El fenómeno de la multirresistencia en *Acinetobacter* se lleva produciendo desde hace tiempo, especialmente la resistencia a los betalactámicos, que va aumentando cada vez más. Por ello muchos investigadores se han dedicado al estudio de los mecanismos que condicionan tal resistencia. Al igual que en otras bacterias gramnegativas, la producción de betalactamasas parece ser uno de los mecanismos principalmente implicados. Joly-Guillou (1988) muestra una elevada actividad betalactamasa, del 80%, en 100 cepas recogidas de diversos hospitales en Francia durante un periodo de 6 años. En nuestro trabajo la producción de betalactamasas fue el 92,9% del total de las cepas de *Acinetobacter* recogidas en el periodo que abarca el estudio (1995-1997), las cuales procedían de enfermos ingresados en diferentes Servicios del Hospital, así como de origen ambulatorio.

La hidrólisis de las betalactamasas mediante la nitrocefina suele observarse entre 1 y 2 minutos, aunque puede tardar más si éstas poseen una baja actividad enzimática (O'Callaghan, 1972; Lorian, 1996). En nuestro estudio se detectó la actividad betalactamasa a los 2 minutos en la mayoría de los aislamientos. Sin embargo en algunas cepas tardó un tiempo cercano a los 5 minutos; en dos de estas cepas no se pudo demostrar la presencia de betalactamasas por isoelectroenfoque. Una escasa actividad enzimática podría explicar la ausencia de bandas de pI, a pesar de que el isoelectroenfoque se considere un método altamente específico y sensible (Matthew, 1975).

En el estudio desarrollado por Joly-Guillou y col. (1988) se intentó caracterizar las enzimas inactivantes de betalactámicos. Mediante isoelectroenfoque y por métodos iodométricos, en presencia de 3 inhibidores (cloxacilina, ácido clavulánico, y sulbactam) se

observó una penicilinas tipo TEM-1 en la mayoría de las cepas (71%), a la que se le atribuía la resistencia a ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. En un 9% se observó una penicilinas CARB-5 con pI 6.3, de igual perfil inhibitorio que la anterior. La presencia de cefalosporinas producida en un alto nivel con $pI > 8$ se demostró en un 41% de las cepas y muchas de ellas (32%) presentaban dos betalactamasas simultáneamente (penicilinas+cefalosporinas), que generalmente correspondían a aislamientos de cepas epidémicas que también producían enzimas inactivantes de aminoglucósidos. Sin embargo, Vila en 1993, observó que el 98% de las cepas con actividad betalactamasa eran de tipo cefalosporinas, mientras que de tipo TEM-1 sólo existía en un 16%, y no obtuvo ninguna enzima tipo carbenicilinas (CARB-5).

Mediante la determinación del pI por isoelectroenfoque y del perfil inhibitorio de manera cualitativa se pudieron caracterizar las betalactamasas detectadas en los aislamientos de nuestro estudio. De manera similar a los datos presentados por Vila en 1993, el elevado porcentaje de cepas betalactamasa positiva se correspondía en gran parte con cefalosporinasas cromosómicas (82%), las cuales presentaban un pI mayor de 8, no se inhibían por ácido clavulánico y sí por cloxacilina y sulbactam, apareciendo la mayoría de ellas como enzimas únicas. Destacamos la escasa detección de enzimas tipo TEM-1 (1 cepa), a diferencia de los estudios mencionados anteriormente; esta betalactamasa se encontró en un solo extracto enzimático que además presentaba una cefalosporinas. Hay que hacer hincapié en la ausencia de enzimas tipo CARB. Por otro lado se obtuvieron 2 tipos de betalactamasas (16 y 1 cepas respectivamente) que, con los estudios de caracterización preliminar, no se les logró encuadrar en ningún esquema clasificatorio, por lo que se consideraron “nuevas betalactamasas” y que fueron objeto de estudio más profundo en posteriores apartados que a continuación se comentan.

5.4.2. Betalactamasas cromosómicas.

Desde 1977, Morohosi atribuye a las cefalosporinasas cromosómicas la resistencia de *Acinetobacter* hacia las cefalosporinas. Estudió las propiedades de una betalactamasa de *A. anitratum* (syn. *calcoaceticus*), la cual poseía un peso molecular de 30 kD, un pH óptimo de 7.25-7.5, y una T óptima de 40°C, no se inhibía por EDTA, pero sí por yoduro en un 30%. Este tipo de enzimas se encuadraron posteriormente en el grupo 1 (CEP-N) de la clasificación de Bush (1989-a) como enzimas no inhibidas por ácido clavulánico. Hikida y col. en 1989 caracterizaron una nueva cefalosporinasa “ML4961” con pI de 9,9 y peso molecular de 38 kD. Este enzima era responsable de la hidrólisis de cefaloridina, cefazolina, cefalotina, cefalexina y cefoperazona. No se inhibía por EDTA, pCMB, ni por el ion yoduro. Blechschmidt en 1992 estudió de nuevo este mismo enzima observando una clara inhibición por cloxacilina, aztreonam, carbenicilina y por sulbactam. No se inhibía por ácido clavulánico, ni siquiera a concentraciones de 0,25 mM, ni por EDTA, ni por p-CMB. Todas estas características hicieron clasificarlas en el grupo de las cefalosporinasas CEP-N.

Estos enzimas tienen en común con otros del grupo 1 la ausencia de inhibición por ácido clavulánico y la inhibición por cloxacilina y aztreonam. Sin embargo a diferencia de éstas, las cefalosporinasas de *Acinetobacter* se inhiben claramente por sulbactam. Joly-Guillou (1988) de manera similar había observado la inhibición por sulbactam y cloxacilina, así como la resistencia a la inhibición por ácido clavulánico en aquellas cepas de *Acinetobacter* que presentaban únicamente cefalosporinasa. Aunque la inhibición por sulbactam pueda sugerir la inclusión en el grupo 2e (Bush, 1989-c) estas

enzimas se suelen inhibir por p-CMB. Por otro lado se ha observado la inhibición por sulbactam en una cefalosporinasa del grupo 1, a partir de una cepa de *Citrobacter freundii* (Bush, 1989-b).

En nuestro estudio se observa claramente la inhibición por cloxacilina, aztreonam y sulbactam, así como la ausencia de inhibición por ácido clavulánico mediante todos los métodos cualitativos del perfil inhibitorio empleados (Figura 4.XII). Del mismo modo los datos del método cuantitativo nos confirman la ausencia de inhibición por ácido clavulánico, que no supera el 40% en ningún caso, así como los porcentajes de inhibición a cloxacilina, aztreonam y sulbactam cercanos al 100%.

El estudio del perfil inhibitorio junto con la determinación del pI por isoelectroenfoque nos permitió caracterizar las betalactamasas de nuestro estudio. Las enzimas pertenecientes al grupo 1 generalmente poseen pIs básicos y masas moleculares mayores a 30 kD. En nuestro caso todas las betalactamasas mostraron un pI superior a 8, lo cual confirma su identidad de cefalosporinasas pertenecientes al grupo 1, al igual que el resto de cefalosporinasas descritas en *Acinetobacter*. Joly-Guillou y col. (1987) describieron 30 cepas de *Acinetobacter* con cefalosporinasa cromosómica que tenía un pI mayor de 8. De las cepas investigadas por Medeiros (1985) el pI variaba entre 8,8 y 10.

Hood y col. (1991) tienen dificultades a la hora de determinar el pI exacto de sus cepas en los geles convencionales, debido a que estas betalactamasas son muy básicas y poseen un gran peso molecular, por lo que no pueden migrar adecuadamente en estos geles. En nuestro estudio hemos logrado con dificultad visualizar 2 pI diferentes, siempre mayores a 8, en 2 grupos de cepas que hemos dividido en: *a* (pI 8,5) y *b* (pI entre 8-8,5).

Dada su proximidad al cátodo, tanto en un grupo como en otro, resultó extremadamente difícil la obtención de fotografías para demostrar dichos pI.

Hood (1991) observó que, a pesar de que todas las betalactamasas de su estudio poseían las características comunes a las de otras betalactamasas de *Acinetobacter*, existía una considerable heterogeneidad entre estas enzimas. En base al pI siempre >8 , la determinación del peso molecular, que era muy elevado (>1000 kD) y otras propiedades bioquímicas describió cuatro tipos diferentes de cefalosporinasas cromosómicas (ACEs). En 1996, Perilli analizó más profundamente diversas cefalosporinasas, dos de ellas presentes en dos especies de *A. baumannii* y una en *A. lwoffii* y observó que se trataba de un grupo heterogéneo con diferentes propiedades cinéticas entre sí y también al compararlas con otras enzimas del grupo 1.

El estudio del perfil inhibitorio mediante el protocolo descrito por Papanicolaou y col. (1994) permite no sólo determinar los porcentajes de inhibición a cualquier sustancia inhibidora, sino también observar la disminución de la inhibición con el tiempo, expresado como “pendiente”. Las diferencias encontradas en este parámetro nos permitirán a su vez distinguir entre las betalactamasas de este estudio, aunque éstas posean similares valores de porcentaje de inhibición.

En la tablas 4.XIII y 4.XIV se pueden observar los máximos porcentajes de inhibición con sus correspondientes valores de “pendiente” a ácido clavulánico, cloxacilina, sulbactam y aztreonam, y a ClNa y EDTA respectivamente, en algunas de las cepas estudiadas. Se exponen principalmente aquéllas que presentan distintos genotipos y diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos, para lograr una mayor diversidad en el tipo de cefalosporinasa.

Papanicolaou (1994) en su estudio observó que, a diferencia de lo que ocurría con la mayoría de las betalactamasas plasmidicas, la mayoría de las cefalosporinasas cromosómicas mostraron perfiles de inhibición muy similares, y apenas se observó disminución en la inhibición con el tiempo. En nuestro trabajo podemos mostrar ciertas diferencias, especialmente en cloxacilina y sulbactam que, como muestra la tabla 4.31 y salvo algunas excepciones, se correlaciona bien con los diferentes pI. La mayoría de las cepas con pI del grupo *a* posee una “pendiente” superior a 0,3 en cloxacilina y sulbactam, sin embargo la mayoría de las del grupo *b* muestran un valor inferior a 0,3 con dichos inhibidores. Existe mayor relación en las cepas que se agrupan en distintos genotipos que en las cepas consideradas de aparición esporádicas, las cuales a pesar de tener pI similares a las anteriores muestran unos porcentajes de inhibición, así como unos valores de “pendiente” totalmente diferentes entre sí.

El pI no es siempre capaz de diferenciar unas betalactamasas de otras; existen algunas enzimas que con igual pI muestran un diferente perfil inhibitorio. Muchas betalactamasas muy relacionadas genéticamente pueden comportarse de diferente modo, mostrando diferentes propiedades en cuanto a la inhibición por ciertas sustancias. Por este motivo Papanicolaou (1994) recomendó distinguir las betalactamasas mediante este estudio.

Para el estudio del perfil de hidrólisis se emplearon 2 métodos: el método microbiológico y el método espectrofotométrico que en general tuvieron buena correlación. Mediante el primer método se pudo determinar la actividad hidrolítica sobre ampicilina, cefalosporinas de 1ª y 2ª generación (cefazolina, cefuroxima), la hidrólisis de cefotaxima pero no de ceftazidima, así como la ausencia de hidrólisis de carbenicilina.

Mediante el ensayo espectrofotométrico se confirmó la actividad cefalosporinasa de estas enzimas, utilizando cefaloridina 100 μ M y bencilpenicilina 1mM en la mayoría de los extractos enzimáticos. Sin embargo en un grupo de ellos fue necesario utilizar una concentración superior de cefaloridina (1mM). El método microbiológico, junto con los datos del perfil inhibitorio también confirmaron la actividad cefalosporinasa. Hay que tener en cuenta que algunas cefalosporinasas hidrolizan la bencilpenicilina aunque no afectan a otras penicilinas; en estos casos es necesario la utilización de otros métodos alternativos que confirmen la actividad cefalosporinasa y las permitan ser encuadradas en el grupo 1 (Bush, 1995). Otro factor a tener en cuenta es el valor de V_{max} y K_m . El estudio de Blechschmidt (1992) mostró que las cefalosporinas eran hidrolizadas más rápidamente que las penicilinas, sin embargo los valores de K_m demostraron una mayor afinidad de las penicilinas por el enzima, que las cefalosporinas. Este autor pudo demostrar mediante la determinación de V_{max}/K_m que en condiciones fisiológicas (sin saturación enzimática del enzima) la hidrólisis de las penicilinas era comparable a la de las cefalosporinas, siendo el mejor sustrato bajo estas condiciones la bencilpenicilina. De ahí la importancia de elegir una concentración adecuada a la hora de estudiar el perfil hidrolítico.

Nosotros diferenciamos en este estudio las cefalosporinasas cromosómicas en 2 grupos *a* y *b*, en función de su diferente pI. Se observó que la mayoría de las betalactamasas con pI *a* pertenecían al genotipo A, y muchas de las que poseían un pI de tipo *b* estaban incluidas en las cepas del genotipo B. Al mismo tiempo observamos que el grupo de cefalosporinasas que mostraban mayor hidrólisis hacia penicilina tenían el pI de tipo *a*. Parece ser que en las cepas de *Acinetobacter* de este estudio existen 2 tipos de cefalosporinasas, que se comportan de manera similar, aunque tienen ciertas diferencias en cuanto a perfil inhibitorio y perfil de hidrólisis.

Respecto a la hidrólisis de las cefalosporinas de amplio espectro, como cefotaxima no se pudo demostrar dicha actividad hidrolítica mediante el método espectrofotométrico, pero sí por el método microbiológico. Parece ser que las tasas de hidrólisis obtenidas para este tipo de sustratos son bastante más bajas por el ensayo espectrofotométrico que por otros métodos (Bush, 1995). De cualquier modo la hidrólisis de ceftazidima no se observó por ninguno de los métodos empleados. Algunos autores afirman que la ceftazidima es menos sensible a la acción de las cefalosporinasas que la cefotaxima pues, como demostraron en algunos estudios, la tasa de hidrólisis de ésta resultó inferior que para cefotaxima (Phillips, 1981; Nayler, 1987).

5.4.2.1. Estudios de inducción de betalactamasas en *Acinetobacter*.

La mayoría de las bacterias gramnegativas producen cefalosporinasas específicas de género y especie. Microorganismos como *E. coli* y *Shigella* spp. producen enzimas constitutivas, generalmente a bajo nivel, codificados por el gen AmpC. Otras como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, etc. producen enzimas inducibles cuya expresión está regulada por el gen AmpD, ante la presencia de una sustancia inductora. Las cefalosporinasas inducibles tienen gran importancia no sólo en clínica, puesto que pueden limitar la eficacia de los antibióticos, sino también a la hora de desarrollar nuevos betalactámicos.

Existen pocos estudios sobre el carácter inducible o constitutivo de las betalactamasas en *Acinetobacter*. La presencia de cefalosporinasas inducibles en este tipo de microorganismos podría explicar la producción de mutantes hiperproductores que darían lugar a la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, sin embargo este carácter

es muy discutible. Morohosi y col. (1977) caracterizaron las cefalosporinasas de 6 cepas de *A. anitratum* (hoy día complejo *A. calcoaceticus-baumannii*) y 1 de *A. lwoffii*, y observaron cómo la actividad enzimática en todas ellas se incrementaba de 5 a 10 veces al tratar las células durante 1 hora a 37°C con bencilpenicilina, cefaloridina y ácido 6-aminopenicilánico. Estos datos junto con las pruebas bioquímicas tan similares a las de las cefalosporinasas inducibles de *P. aeruginosa*, *C. freundii* y *E. cloacae*, les hizo considerar que las cefalosporinasas de *Acinetobacter* eran de expresión inducible.

Bauerfeind (1986) por otro lado describió estas enzimas como inducibles o constitutivas indistintamente. Hood y col. (1991) consideraron que la producción de las betalactamasas de *Acinetobacter* puede ser de forma constitutiva, ya que no observaron la inducción con cefoxitina en ninguna de las 8 cepas estudiadas. Blechsmidt y col. en 1992 observan la inducción de una cefalosporinasa por varios betalactámicos, incluido ampicilina e imipenem, obteniendo los mejores resultados con cefotaxima que consiguió una actividad enzimática del 90% en el medio de cultivo. La localización extracelular se explicó por un posible proceso de transporte a través de la membrana celular, aunque también se consideró la posibilidad de que hubiera otro tipo de betalactamasa no inducible retenida en el interior de las células.

En nuestro estudio se han intentado demostrar las propiedades inducibles o constitutivas de las cefalosporinasas cromosómicas caracterizadas previamente. Para ello se escogieron todas aquellas cepas sensibles por dilución en agar a las cefalosporinas de 3ª generación, o incluso con resistencia a bajo nivel pero sensibles por difusión en disco. Observamos por los 2 métodos empleados que nuestras cepas no eran inducibles, a diferencia de la cepa control (*Serratia marcescens*) que sí mostraba inducción.

Una hipótesis que explicara la elevada CMI a las cefalosporinas de 3ª generación que presentan muchos de los aislamientos de nuestro estudio podría ser la producción de mutantes hiperproductores a partir de betalactamasas de expresión constitutiva. Este mecanismo se ha descrito en un bajo porcentaje de cepas de *E. coli*, cuando el gen AmpC se produce en grandes cantidades, elevando los niveles de CMI hacia las cefalosporinas de 3ª generación (Benett, 1993; Bergstrom, 1979).

5.4.2.2. Hiperproducción de betalactamasas cromosómicas.

La hiperproducción de betalactamasas inducibles se produce como consecuencia de una mutación en el gen regulador de la inducción AmpD, originando una sobre-expresión de dichas enzimas que causan un incremento en la resistencia antimicrobiana. De este modo algunas cefalosporinas de amplio espectro, como cefotaxima, que normalmente son estables a la acción de las betalactamasas resultan inactivas. Se ha demostrado en *E. cloacae* que 2 de sus principales cefalosporinasas cromosómicas son responsables de la elevada resistencia a cefotaxima, ya que al haberse producido una mutación en su gen regulador, ha pasado la producción inducible a ser constitutiva (Seeberg, 1983). La hiperproducción de betalactamasas cromosómicas constitutivas se produce más raramente en *E. coli* a partir de un doble mecanismo de mutación, o bien por la adquisición de un promotor más eficaz en el caso de *Shigella*. El incremento de la resistencia observada tras la hiperproducción de AmpC en *E. coli* produce un fenotipo de resistencia a betalactámicos similar a las cepas de *E. cloacae* que poseen hiperproducción, como es la resistencia a todos los betalactámicos excepto a los carbapenémicos, temocilina y mecilínam. Sin embargo los valores de CMI observados en *E. coli* no son tan elevados. Este hecho se podría explicar porque se produzca menos

cantidad, y/o por la mayor permeabilidad de *E. coli* con respecto a *E. cloacae* (Livermore, 1995).

Para el estudio de hiperproducción de betalactamasas en *Acinetobacter* escogimos varias cepas representativas de cada genotipo determinado por rep-PCR, de los cuales cada una presentaba diferentes perfiles de resistencia a betalactámicos, e incluso con distintos niveles de resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación (CTX, CAZ). Se observó la hiperproducción en la mitad de las cepas estudiadas. Podemos deducir de los resultados de la tabla 4.37, cómo la mayoría de estas cepas presentaban alto nivel de resistencia a cefalosporinas, especialmente a cefotaxima. Las cepas no hiperproductoras se correspondían con aquellas cepas sensibles a cefalosporinas de 3ª generación, o resistentes con un bajo nivel de resistencia a cefotaxima.

Dos cepas resistentes a ceftazidima no mostraron hiperproducción, sin embargo contaban con un bajo nivel de resistencia a cefotaxima (cepas 86 y 155). Cefotaxima parece ser un antibiótico que discrimina mejor la hiperproducción de cefalosporinasas (Joly-Guillou, 1988; Phillips, 1981). Podemos deducir de nuevo que, la producción de cefalosporinasas cromosómicas afecta más a cefotaxima que a ceftazidima, como se refleja en los resultados de hiperproducción.

Los resultados del estudio de hiperproducción de cefalosporinasas apoyan la hipótesis anteriormente explicada, en la que se considera que la hiperproducción puede deberse a una producción en mayor cantidad de betalactamasa constitutiva, que eleva la CMI hasta valores muchas veces superiores a 64 mg/l en algunas cefalosporinas, coincidiendo con los valores que presentan algunas cepas desreprimidas de *E. cloacae*. La escasa permeabilidad celular que posee *Acinetobacter*, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, contribuye aún más a la elevación en la CMI.

5.4.3. Resistencia a carbapenémicos mediada por betalactamasas.

Los carbapenémicos son antibióticos con anillo betalactámico, que difieren del resto de antibióticos betalactámicos no sólo en su estructura molecular sino también en el espectro antibacteriano. Son activos frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, incluso frente a las cepas gramnegativas productoras de betalactamasas cromosómicas desreprimidas y frente a cepas productoras de betalactamasas de espectro ampliado.

El uso de este grupo de antimicrobianos se ha incrementado cada vez más debido a su amplio espectro, originándose la aparición de cepas resistentes a estos antibióticos (Livermore, 1993). La resistencia a carbapenémicos también está aumentando de forma significativa en *Acinetobacter*, aunque su relación con la producción de betalactamasas está aún en discusión (Livermore, 1997). Desde la aparición de ARI-1, la primera carbapenemasa descrita en *Acinetobacter* (Paton, 1993), que pudo ser transferida por conjugación (Scaife, 1995) han surgido en diversos países del mundo, como Argentina, Francia, Brasil, Cuba, otras nuevas enzimas que hidrolizan imipenem, aún pendientes de caracterizar totalmente (Horstein, 1997; Brown, 1996; Costa, 1996; Perez, 1996). La mayoría de estas carbapenemasas son de naturaleza serina-enzima, a diferencia de las carbapenemasas descritas en otras bacterias como las de *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophyla*, etc. (Rasmussen, 1997).

De los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad antimicrobiana se puede observar que a partir del año 1996 y 1997 hubo una significativa reducción en la sensibilidad a imipenem y meropenem. Estos datos coincidieron en el tiempo con la aparición de las llamadas “nuevas betalactamasas” que, como se puede deducir en el correspondiente apartado de resultados, están implicadas en la resistencia a dichos

antibióticos. Estas nuevas betalactamasas presentaban ciertas diferencias. Una de ellas se había encontrado en varios aislamientos de distintos pacientes, en los que posteriormente se comprobó su relación genética entre sí, y se observó que presentaba valores de CMI en general muy elevados, siendo los de imipenem y meropenem de 128 y > 128 mg/l respectivamente. De estas cepas se escogió una de ellas (cepa 113), como representativa para los estudios de caracterización de betalactamasas. La otra betalactamasa procedía de un aislamiento (cepa 38) de un sólo paciente que mostró un valor de CMI a imipenem y meropenem inferior (8 y 16 mg/l respectivamente).

La cepa 113 presentaba un pI de 7,7 y se pudo encuadrar en el grupo de las “serina-enzimas”, como la mayoría de las carbapenemasas descritas en *Acinetobacter* hasta el momento, ya que la inhibición por EDTA fue negativa. El elevado pI, cercano a 8 en un principio pudo hacer pensar que se trataba de una cefalosporinasa, ya que se han descrito casos de cefalosporinasas asociadas a la resistencia a carbapenémicos, no sólo en *Acinetobacter* sino en otras bacterias como *E. cloacae* (Dib, 1994; Bush 1985; Then, 1988), aunque generalmente estos mecanismos estaban relacionadas con otros mecanismos de resistencia (alteración de las OMPs o de las PBPs). Sin embargo estudios posteriores descartaron esta posibilidad; el perfil inhibitorio mostró la ausencia de inhibición no sólo por ácido clavulánico, sino por cloxacilina, sulbactam y aztreonam.

Mediante el estudio del perfil de hidrólisis, tanto por el método microbiológico como por el espectrofotométrico se consideró este nuevo enzima como una penicilinasas, ya que afectaba principalmente a bencilpenicilina. Por el método microbiológico se observó la hidrólisis de ampicilina, cefazolina, cefuroxima y cefotaxima.

El método microbiológico permitió a su vez demostrar su actividad como carbapenemasa, por la clara hidrólisis de imipenem y meropenem a diversas diluciones.

Sin embargo mediante el ensayo espectrofotométrico no se observó actividad enzimática hacia ninguno de estos antibióticos a las concentraciones utilizadas.

Thomson (1993) demostró la actividad carbapenemasa de una cefalosporinasa por métodos microbiológicos. El método espectrofotométrico no fue lo suficientemente sensible como para detectar diferencias cuantitativas en la baja tasa de hidrólisis que presentaba imipenem. Harstein y col. (1997) de igual modo describen una carbapenemasa en *A. baumannii* y demuestran la hidrólisis de imipenem por métodos diferentes al espectrofotométrico. La cepa mostró gran actividad hidrolítica hacia las penicilinas, siendo las penicilinas isoxazólicas el mejor sustrato; también se observó actividad frente a las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. La actividad hacia las cefalosporinas de 3ª generación y hacia los carbapenémicos fue muy baja. Sin embargo el enzima mostró tener gran afinidad por imipenem (baja K_m) por lo que se consideró que éste era un buen sustrato, tanto como la oxacilina, en términos de eficacia catalítica.

Estos autores por tanto describían por primera vez una oxacilinasas implicada en la resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter*. En otros estudios sobre betalactamasas se hace referencia a la presencia de oxacilinasas en estos microorganismos, pero no con un espectro de hidrólisis tan elevado como para afectar a los carbapenémicos. Por otro lado se está observando cada vez más, especialmente en *Pseudomonas* la aparición de oxacilinasas de amplio espectro (Hall, 1993; Danel, 1996; Danel, 1997; Naas, 1997; Naas, 1998; Nordmann, 1998).

En un intento de caracterización más profunda de las nuevas betalactamasas descritas en nuestro trabajo, estudiamos la hidrólisis de carbenicilina y oxacilina, ya que esto permitiría encuadrarlas en carbenicilinasas u oxacilinasas. El método microbiológico demostró la hidrólisis de ambos antibióticos, sin embargo el método espectrofotométrico

únicamente determinó la actividad hidrolítica para carbenicilina, que fue bastante elevada, sin embargo no se pudo determinar ésta para el caso de oxacilina. La ausencia de inhibición por CINA podría descartar la posibilidad de que se tratara de una oxacilinasas (Matthew, 1979), sin embargo al no tener valores cuantitativos sobre la eficacia comparativa de la hidrólisis de ambos antibióticos no podemos decantarnos por un tipo de betalactamasas u otro.

La betalactamasa correspondiente a la cepa 38 presentó un pI de 6,8. Se comprobó de igual modo que en la enzima anterior, la actividad carbapenemasa por métodos microbiológicos, y la actividad penicilinasas por métodos espectrofotométricos. Este enzima parece afectar algo menos a las cefalosporinas de amplio espectro como muestra el perfil hidrolítico, y de nuevo se muestra una actividad hacia carbenicilina y oxacilina únicamente demostrable por el método microbiológico.

Mediante el protocolo de Harstein y col. (1990) se pudo observar el diferente perfil plasmídico que presentaban ambas cepas. Uno de los plásmidos de la cepa 113 se perdió tras el curado con Bromuro de Etidio, además se mostraron unos valores de CMI inferiores que en la cepa original, especialmente en imipenem y meropenem, así como la ausencia de bandas de pI. Este estudio permitió demostrar no sólo la naturaleza plasmídica de esta betalactamasa sino también confirmar su implicación en la resistencia a imipenem.

Se han descrito en *Acinetobacter* otras betalactamasas que confieren resistencia a carbapenémicos y a otros antimicrobianos, y que van codificadas en plásmidos u otros elementos genéticos móviles (Scaife, 1995; Vila, 1997). Desde 1983 Goldstein demuestra la resistencia a ampicilina, aminoglicósidos y sulfamidas por un plásmido, que

pertenecía a un grupo de plásmidos muy comunes a otros encontrados en diferentes bacterias, y que incluía la enzima TEM-1, además de algunos enzimas inactivantes de aminoglicósidos.

Hay que considerar que *Acinetobacter* es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza, donde puede sobrevivir largo tiempo, y compartir material genético con otras bacterias, adquiriendo elementos genéticos móviles como plásmidos, integrones o transposones, que conllevan la resistencia a múltiples antimicrobianos.

5.5. ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD CELULAR. COMO MECANISMO DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS.

Acinetobacter es un microorganismo que exhibe una amplia multiplicidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos, tanto intrínseca como adquirida. Se ha demostrado que la permeabilidad de este microorganismo a las penicilinas, cefalosporinas y probablemente a otros antibióticos como las fluorquinolonas es del 1% con respecto a la permeabilidad observada en *E. coli*.

Existen pocos estudios acerca de las proteínas de la membrana externa de *Acinetobacter*, así como de su relación con la permeabilidad y con la resistencia a los antibióticos. En 1991 los primeros estudios sobre permeabilidad en *Acinetobacter* hacen referencia a unas proteínas que poseen un pequeño diámetro, demostrándose su papel como porinas en la bacteria (Sato, 1991). Posteriormente en ese mismo año se estudia de nuevo una porina de tamaño similar, responsable de la resistencia a varias cefalosporinas (Obara, 1991).

En nuestro trabajo hemos comparado el perfil de OMPs de nuestras cepas y hemos observado el predominio de 3 OMPs mayoritarias, pero no hemos encontrado ninguna diferencia entre las OMPs de las cepas que, perteneciendo al mismo genotipo poseían diferentes grados de resistencia, ni siquiera entre las más sensibles (fenotipo I) y las más resistentes (fenotipo IVb).

Las alteraciones en la permeabilidad de la pared celular tienen un gran interés si se relacionan con la resistencia a carbapenémicos. Se ha demostrado claramente que la ausencia de una porina minoritaria OprD2 en *P. aeruginosa* está implicada en la

resistencia a imipenem; sin embargo en *Acinetobacter* la implicación de las porinas en la resistencia a carbapenémicos está aún sin definir.

Gehrlein en 1991 quiso relacionar la resistencia a imipenem con este mecanismo de resistencia, o bien asociado a otros mecanismos como la producción de cefalosporinasa o las alteraciones de las PBPs, para lo que comparó 2 cepas isogénicas, siendo una de ellas resistente a este antimicrobiano. Comprobó un idéntico perfil de OMPs en ambas cepas, constituido por 5 proteínas mayoritarias, y demostró que la resistencia a imipenem se debía en este caso a alteraciones en las PBPs. Otros estudios sin embargo demostraron que la resistencia a imipenem se debía a la disminución de una OMP de 46 kD (Dib, 1994), pero asociada a la producción de cefalosporinasa junto a alteraciones en las PBPs. De nuevo en 1996 Clark demuestra la ausencia de una porina de 33-36 kD implicada como mecanismo de resistencia a este antimicrobiano.

En nuestro caso podemos observar que los perfiles de OMPs de las cepas resistentes a imipenem, tanto las relacionadas genotípicamente como la cepa no relacionada, son muy similares al resto de los perfiles encontrados, en las que no se aprecia disminución ni ausencia de ninguna proteína de membrana externa. La permeabilidad es un factor importante contribuyente a la resistencia antimicrobiana, pero muchas veces no es el único responsable. La baja permeabilidad no siempre es la causa de elevación de la CMI; dependerá de la habilidad del antibiótico para entrar en la célula y también de la capacidad de las enzimas inactivantes de eliminarlo. El hecho de que en estas cepas se hayan encontrado betalactamasas directamente relacionadas con la resistencia a carbapenémicos puede explicar la resistencia a estos antimicrobianos.

5.6. RELACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA CON LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN *ACINETOBACTER*.

El principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en *Acinetobacter* es la producción de betalactamasas, sin embargo aunque este microorganismo presenta una elevada resistencia antimicrobiana la relación entre ambos hechos no está claramente definida. La predicción de la presencia de enzimas inactivantes a partir del antibiograma no es fácil en aquellos microorganismos que, como *Acinetobacter* no presentan una estrecha relación entre el tipo de enzima producida y los valores de CMI observados (Livermore, 1995).

Con el fin de analizar la producción de betalactamasas y relacionarla con los distintos niveles de resistencia observados en *Acinetobacter*, Joly-Guillou definió en 1988, cuatro fenotipos de resistencia a betalactámicos, en función de su sensibilidad o resistencia a ticarcilina, piperacilina, cefotaxima y ceftazidima. Estos grupos distinguían entre las cepas más sensibles (Grupo I), las resistentes únicamente a las penicilinas (Grupo II), aquellas resistentes solamente a las cefalosporinas de 3ª generación (Grupo III), y por último las resistentes a los 2 grupos de betalactámicos (Grupo IV). Observaron un gran predominio de los aislamientos resistentes a todos los betalactámicos (Grupo IV), seguido de aquellas cepas que presentaban resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima y ceftazidima. Bergogne-Bérézin en 1995 reorganizó esta clasificación, y dado la aparición cada vez mayor de cepas resistentes a los carbapenémicos, añadió un grupo más, el Grupo V, que incluía a las cepas resistentes a todos los betalactámicos, incluido el imipenem. Al mismo tiempo modificó los Grupos III

y IV dividiéndolos en a y b, según la resistencia a ceftazidima. Observó el predominio de cepas resistentes únicamente a las cefalosporinas, a diferencia de lo que se había descrito en 1988.

En nuestro estudio nos basamos en la definición de fenotipo de resistencia establecida por Bergogne-Bérézin (1995). Se siguieron por una parte los criterios de puntos de corte de las normas del NCCLS de 1998 (criterio A), determinadas para *Acinetobacter*, al igual que para establecer los valores de CMI₅₀, CMI₉₀ y porcentajes de sensibilidad antimicrobiana. Los puntos de corte que hasta el momento se habían utilizado para microorganismos no fermentadores (NCCLS, 1997;) difieren en algunos antibióticos, como ticarcilina y piperacilina, por lo que también estudiamos los perfiles de resistencia a betalactámicos, atendiendo a este criterio (criterio B), y así posteriormente compararlos con los actuales.

Según las normas del NCCLS de 1998 (criterio A) se observó un mayor predominio de cepas incluidas en el Grupo IV, pero según el criterio B predominaron las cepas del grupo III, seguido del Grupo IV. Comparando ambos resultados se observó que los resultados obtenidos en 1995 por Bergogne-Bérézin se asemejaban con las normas establecidas según el criterio B. (NCCLS, 1997).

A la hora de comparar el fenotipo de resistencia con la producción de betalactamasas se observó en general una buena correlación, salvo algunas excepciones. Mediante las normas de 1998 se muestra cómo la gran mayoría de cepas productoras de cefalosporina cromosómica parecen presentar resistencia, no sólo a las cefalosporinas de amplio espectro, sino también a ticarcilina y piperacilina. Sin embargo si observamos la tabla 4.48, donde se siguen los criterios de años anteriores, observamos una mayor correlación entre cepas productoras de cefalosporinasa y resistencia a cefalosporinas de

3ª generación. Hay que tener en cuenta que ambas normas se distinguen por pequeñas diferencias en los valores de CMI para ticarcilina y piperacilina.

Muchas veces es más útil considerar la definición de resistencia según un criterio microbiológico, en el que por pequeños cambios en los valores de CMI se detectan bajos niveles de resistencia, que si sólo se tiene en cuenta el criterio farmacológico, el que normalmente presenta el NCCLS y otras Normas similares, referidos a la concentración de la droga alcanzable en suero, en los que tienen que haber grandes cambios en la CMI, para considerar la cepa sensible o resistente (Livermore, 1995). En nuestro caso una pequeña variación en la CMI de ticarcilina, de 64 a 128 mg/l, permitió establecer una mejor relación con la producción de betalactamasas.

En nuestro estudio se observó en general una elevada producción de betalactamasas (93%), que se relacionaba con un predominio de cepas multirresistentes. Llama la atención la ausencia de enzimas tipo CARB-5 en el total de cepas estudiadas, así como la presencia de enzimas tipo TEM-1 en un único aislamiento, donde también se encontraba una cefalosporinasa. Esta cepa mostró un elevado nivel de resistencia a ticarcilina (512 mg/l) y fue sensible a las cefalosporinas de 3ª generación, correspondiéndose con la única cepa perteneciente al genotipo II, según el criterio B. La asociación de ticarcilina con ácido clavulánico, que disminuyó considerablemente la CMI a ticarcilina (16 mg/l) confirmó que este enzima era el responsable de la resistencia a este grupo de betalactámicos.

Joly-Guillou (1988) en su estudio demuestra que el predominio de cepas del Grupo IV, así como la presencia de un considerable porcentaje de cepas del Grupo II, se correlacionaba con la presencia de enzimas TEM y/o CARB-5, asociadas en algunos casos a cefalosporinasas y con valores de CMI superiores a 128 mg/l. Encontraron un

elevado porcentaje de cepas productoras de TEM-1, y/o CARB-5, que presentaban altos niveles de resistencia a ticarcilina y piperacilina (CMI >256 mg/l), y en los que las asociaciones de estos antibióticos con inhibidores de betalactamasas hacían disminuir su CMI considerablemente.

En nuestro caso igualmente podríamos explicar porqué en la mayoría de cepas donde no se había encontrado penicilinas la resistencia a ticarcilina no es tan elevada (alrededor de 64-128 mg/l) y porqué los inhibidores, salvo ampicilina-sulbactam, reducen los valores de CMI únicamente en una o dos diluciones, mostrándose bajos porcentajes de sensibilidad.

Estos resultados permiten confirmar aún más la relación de fenotipo de resistencia y betalactamasas, empleando dicho criterio en el que el punto de corte para las penicilinas es superior a 128 mg/l. Un punto de corte mayor sería más adecuado para establecer una mejor relación entre antibiograma y producción de betalactamasas.

Respecto a las cepas betalactamasa (negativa) observamos que la mayoría fueron incluidas en el Grupo I, que correspondía a cepas con elevada sensibilidad, o a aquéllas con valores de CMI tan bajos que no superaron los puntos de corte como para ser consideradas resistentes. La mayoría de las bacterias gramnegativas poseen cefalosporinasas cromosómicas específicas de cada género y especie. Muchas de ellas se expresan a un bajo nivel, tal que no se detectan por los mecanismos de detección de betalactamasas, por lo que se consideran betalactamasa (negativa) (Nikaido, 1985). Incluso las cepas con escasa actividad betalactamasa suelen producir cierta elevación de la CMI de los antibióticos, pero esta elevación no suele percibirse con los criterios

normalmente empleados para establecer la resistencia o sensibilidad. Así se explica cómo existen cepas betalactamasa (positiva) que pertenecen al Grupo I.

Mayor importancia tienen aquellas cepas que presentan elevados niveles de resistencia a penicilinas y/o a cefalosporinas (Grupos III, IV) y sin embargo son betalactamasa negativa.

Las bacterias escapan a la acción de los betalactámicos de varias maneras; por un lado la presión antibiótica puede seleccionar las cepas deficientes en porinas, que tienen la permeabilidad reducida, por otro lado la producción de un gran número de betalactamasas con gran afinidad por los antibióticos contribuye a la resistencia, y también pueden aparecer nuevas betalactamasas que hidrolicen nuevos antimicrobianos. Joly-Guillou explica la elevada resistencia a cefalosporinas de algunas de sus cepas betalactamasa (negativa) por una posible reducción en la permeabilidad celular, sin embargo en este trabajo hemos comprobado que no existe ninguna alteración en las OMPs de nuestros aislamientos de *Acinetobacter*, por lo que únicamente otros mecanismos, como las alteraciones de las PBPs podrían estar implicados en estos casos.

5.7. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS EN CEPAS RELACIONADAS GENÉTICAMENTE Y CEPAS ESPORÁDICAS.

La mayoría de las infecciones de origen hospitalario están causadas por bacterias resistentes a uno o más agentes antimicrobianos. La distinción entre brote y cepa de aparición esporádica se puede realizar únicamente en el laboratorio, mediante la aplicación de técnicas que reconozcan semejanzas y diferencias entre los diferentes aislamientos.

En este trabajo agrupamos todos los aislamientos de *Acinetobacter* obtenidos en los años 1995, 1996 y 1997, según su relación genética, establecida por rep-PCR, en concordancia con otros métodos fenotípicos. De esta manera se obtuvieron 3 grupos genéticamente relacionados, procedentes de distintos Servicios del hospital, pero mayoritariamente de la UCI, obtenidos en un gran porcentaje de muestras respiratorias. El resto de aislamientos no tenían relación genotípica entre sí y la mitad de ellos procedían de origen ambulatorio.

En cuanto a la relación de los distintos grupos genómicos con los mecanismos de resistencia a betalactámicos observamos que, en general las cepas más resistentes a los antibióticos eran aquellas cepas epidémicas de origen nosocomial. Mostraban un perfil de elevada resistencia a betalactámicos, distribuyéndose entre los Grupos III, IV y V. Al mismo tiempo presentaban elevados niveles de resistencia a otros antibióticos no betalactámicos.

Las cepas consideradas de aparición esporádica fueron en general más sensibles, pertenecían la mayoría al Grupo de resistencia I y fueron las únicas cepas que mostraban

cierta sensibilidad hacia los antibióticos “no usuales”, como azitromicina o rifampicina, frente a los que el resto de aislamientos se mostraron resistentes.

La resistencia antimicrobiana en general es más común cuando el uso de antibióticos es mayor; existe una relación directa con el grado de presión selectiva. La resistencia es elevada especialmente en Unidades de Cuidados Intensivos, Hematología, Unidades de Quemados. Igualmente ocurre en países en vías de desarrollo, donde no existe un adecuado uso de antimicrobianos. Especialmente ocurre en infecciones recalcitrantes, en las que se da una exposición de la bacteria al antibiótico repetidamente. Sin embargo la resistencia es mucho menor cuando se tratan infecciones adquiridas en la Comunidad de países desarrollados (Eliner, 1987; Sanders, 1992).

Dijkshoorn en 1996 comparó las cepas de *Acinetobacter* implicadas en un brote nosocomial con cepas que aparecían esporádicamente en el medio hospitalario. Comprobó cómo las cepas productoras de brotes en general fueron más resistentes que las no relacionadas genéticamente. La uniformidad que presentaban las cepas implicadas en brotes hizo pensar que todas ellas procedían de un origen clonal común.

Nosotros hemos comprobado en este trabajo que dentro del grupo de cepas epidémicas destaca como grupo predominante el genotipo A, seguido del grupo B. Al comparar los porcentajes de sensibilidad antimicrobiana en los distintos genotipos observamos que dentro de éstos el grupo A es más resistente que el resto. Cabe destacar la procedencia de UCI de la mayoría de cepas incluidas en este grupo.

Al comparar la distribución de las betalactamasas en los distintos grupos, se puede comprobar cómo predomina la producción de cefalosporinasas cromosómicas en los principales grupos A, B y C frente a las cepas esporádicas, donde muchos aislamientos son betalactamasa (negativa).

Coincidiendo con la elevada resistencia antimicrobiana, incluida a carbapenémicos se observa cómo alrededor del 90% de las cepas posee únicamente cefalosporinasa cromosómica y por otro lado un gran porcentaje de cepas del grupo A poseen un mismo tipo de carbapenemasa. Las diferencias en la sensibilidad en un mismo grupo genotípico, por un lado nos indica que tras el resultado de la presión selectiva ejercida por el consumo prolongado de este antibiótico se ha podido producir un brote de cepas resistentes a imipenem, a partir de un clon de cepas ya existentes.

Desde el punto de vista de la producción de betalactamasas, se puede explicar fácilmente la posibilidad de adquisición de un plásmido de resistencia a carbapenémicos que condujera al aumento de la resistencia a estos antimicrobianos.

Hasta 1986 (Joly-Guillou, 1986) la resistencia a imipenem se había descrito de manera esporádica, como ocurre en nuestro caso con la cepa 38, productora de una carbapenemasa. Sin embargo se ha demostrado en estudios posteriores (Tankovic, 1994) que la resistencia a este antibiótico también se observa en brotes hospitalarios; como demuestra Go (1994) en su estudio, donde tras el prolongado consumo de imipenem surge una epidemia por *Acinetobacter* multirresistente (únicamente sensible a polimixina y sulbactam), que derivaba de un clon previo más sensible.

6. CONCLUSIONES.

- 1.- Los aislamientos de *Acinetobacter* spp. incluidos en este estudio presentan una baja sensibilidad antimicrobiana a la mayoría de los antibióticos estudiados. Colistina, imipenem, meropenem, ampicilina/sulbactam y sulbactam son los antimicrobianos con mayor actividad *in vitro*. Rifampicina y azitromicina muestran alguna actividad frente a las cepas de *Acinetobacter* más sensibles al resto de antibióticos.
- 2.- Se observa una tendencia a la disminución de la sensibilidad con el tiempo, destacando en los dos últimos años la aparición de cepas resistentes a carbapenémicos.
- 3.- Observamos una estrecha relación entre los patrones de resistencia a betalactámicos y la presencia de betalactamasas al aplicar el criterio del NCCLS de 1997 para microorganismos gramnegativos no fermentadores.
- 4.- La mayoría de los aislamientos presentan resistencia a cefalosporinas de 3ª generación. Otro grupo importante muestra además resistencia a carboxi- y aminopenicilinas.
- 5.- Las cepas de *Acinetobacter* relacionadas genéticamente (genotipos A, B y C) proceden en su mayoría de enfermos ingresados, generalmente en UCI y son más resistentes que las cepas no relacionadas, obtenidas en gran parte de muestras de enfermos no ingresados.

- 6.- La producción de betalactamasas es el principal mecanismo implicado en la resistencia a betalactámicos en los aislamientos de este estudio. La mayoría de las betalactamasas son cefalosporinasas cromosómicas del grupo 1, seguido por un grupo de enzimas tipo carbapenemasa. Hay que destacar la presencia de enzimas tipo TEM-1 en un único aislamiento y la ausencia de enzimas tipo CARB-5 en el total de cepas.
- 7.- Mediante el punto isoelectrico, perfil de inhibición y de hidrólisis podemos observar cierta heterogeneidad entre las cefalosporinasas de *Acinetobacter* estudiadas.
- 8.- La elevada resistencia a las cefalosporinas de 3ª generación se produce por una hiperproducción de cefalosporinasas cromosómicas constitutivas. La hiperproducción de cefalosporinasas afecta más a cefotaxima que a ceftazidima.
- 9.- La resistencia a carbapenémicos en los aislamientos de *Acinetobacter* del presente estudio se debe a dos diferentes carbapenemasas de tipo “serina-enzimas”, con actividad penicilinasas, que además hidrolizan carbenicilina y oxacilina. Ninguno de estos enzimas se inhibe por ácido clavulánico, cloxacilina, sulbactam, aztreonam, ni cloruro sódico. Una de las carbapenemasas predomina en un grupo de cepas incluidas en un mismo genotipo.

10.- La mayoría de las cepas muestran un idéntico perfil de OMPs, en el que predominan 3 OMPs principales de 42, 27 y 17 kD. La alteración de la permeabilidad de la pared celular no parece estar implicada en los mecanismos de resistencia a betalactámicos en los aislamientos clínicos de *Acinetobacter* estudiados, ya que no se han encontrado diferencias en dichos perfiles de OMPs, ni siquiera en cepas resistentes a carbapenémicos.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1- Actis LA, Tomalsky ME, Crosa LM, Crosa JH. Effect on iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2812-2815.
- 2- Al-Khoja MS, Darrell JH. The skin as the source of *Acinetobacter* and *Moraxella* species occurring in blood cultures. J Clin Microbiol 1979; 32: 497-499.
- 3- Alphonsus U, Okpara Maswoswe JJ. Emergence of multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. Am J Hosp Pharm 1994; 51: 2671-2675.
- 3- Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* species. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practises of infectious diseases. Nueva York, Churchill Livingstone, 1995: 2009-2013.
- 4- Allen KD, Green HT. Hospital outbreaks of multiresistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread?. J Hosp Infect 1987; 9: 110-119.
- 5- Andrews HJ. *Acinetobacter* bacteriocin typing. J Hosp Infect 1986; 7: 169-175.
- 6- Ang SW, Lee ST. Emergence of a multiply-resistant strain of *Acinetobacter* in a burns unit. Ann Acad Med Singapore 1992; 21: 660-663.
- 7- Anstey NM. Community-acquired *Acinetobacter* pneumonia in the northern territory of Australia. Clin Infect Dis 1992; 14: 83-91.

-
- 8- Anstey NM. Use of cefotaxime for treatment of *Acinetobacter* infections. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 374.
- 9- Arthur M, Brisson A, Carlier C, Courvalin P, Deerlot E, Gerbaud G, Leclercq R, Martin P, Ounissi H, Trieu-cuot P. Techniques d'étude du support génétique de la résistance aux antibiotiques. Protocole 3. Parte plasmidique spontanee et provoquee. En: Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J. L'antibiogramme. MPC-Videon 1985; 265-266.
- 10- Aubert G, Grimont F, Zéni F, Pain P, Michel VP, Vautrin AC, Vedel G, Bouvet P. *Acinetobacter baumannii* outbreak isolates characterized by three typing methods. *EurJ Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 1095-1099.
- 11- Aubert G, Guichard D, Vedel G. *In vitro* activity of cephalosporins alone and combined with sulbactam against various strains of *Acinetobacter baumannii* with different antibiotics resistance profiles. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 155-160.
- 12- Avril JL, Mesnard R. Factors influencing the virulence of *Acinetobacter*. En: Towner KJ, Bergogne-Bérézin E, Fewson CA. The biology of *Acinetobacter* FEMS Symposium n° 57. Nueva York, Plenum Press, 1991.
- 13- Ayliffe GAJ, Babb JR, Davies JG, Lilly HA. Hand disinfection: a comparison of various agents in laboratory and ward studies. *J Hosp Infect* 1988; 11: 226-243.

-
- 14- Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J Bacteriol 1968; 96: 39-42.
- 15- Beckwith DG, Jahre JA. Role of a cefoxitin inducible betalactamase in a case of breakthrough bacteremia. J Clin Microbiol 1980; 12: 517-520.
- 16- Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of betalactamase induction in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 153-158.
- 17- Bergogne-Berézin E, Joly-Guillou ML. An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1985; 16: 535-538.
- 18- Bergogne-Berézin E, Joly-Guillou M, Morel C, Avril JL. Betalactam resistance in *Acinetobacter baumannii*: a six year multicenter surveillance in France. En: Program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco 1995; resumen: E 94.
- 20- Bergogne-Berézin E, Joly-Guillou ML, Vieu JF. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. J Hosp Infect 1987; 10: 105-113.
- 21- Bergogne-Berézin E, Joly-Guillou ML. Hospital infection with *Acinetobacter* spp: an increasing problem. J Hosp Infect 1991; 18 (suppl A): 250-255.

-
- 22- Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-165.
- 23- Bergstrom S, Normark S. Betalactam resistance by clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the *ampC*-mediated chromosomal betalactamase. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16: 427-433.
- 24- Berk SL, and McCabe WC. Meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*: a specific hazard in neurosurgical patients. Arch Neurol 1981; 38: 95-98.
- 25- Bernards AT, Dijkshoorn L, van der Toorn J, Bochner BR, van Boven CPA. Phenotypic characterisation of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the Biolog system. J Med Microbiol 1995; 42: 113-119.
- 26- Blahova J, Hupkova-Lesicka M, Kralikova K, Krcmery V, Kubonova K. The effect of cefepime on ceftazidime, cefotaxime and imipenem resistant strains of *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and on producers of extended spectrum beta-actamases (ESBL) with resistance transfer. Cas Lek Cesk 1997; 136: 154-156.

-
- 27- Blechschmidt B, Borneleit P, Kleber HP. Purification and characterization of an extracellular betalactamase produced by *Acinetobacter calcoaceticus*. J Gen Microb 19992; 138: 1197-1202.
- 28- Boujaafar N, Freney J, Bouvet PJM, Jeddi M. Cell surface hydrophobicity of 88 clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Rev Microbiol 1990; 141: 477-482.
- 29- Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter twoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1986; 36: 228-240.
- 30- Bouvet PJM, Grimont, PAD. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur/Microbiol 1987. 138: 569-578.
- 31- Bouvet PJM, Jeanjean S, Vieu JF, Dijkshoorn L. Species, byotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. J Clin Microbiol 1990; 28: 170-176.
- 32- Bouvet PJM, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genospecies in the genus *Acinetobacter*. Res. Microbiol. 1989; 140: 291-299.

- 33- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- 34- Brown S, Bantar C, Young H, Amyes SGB. An outbreak of imipenem resistance in *Acinetobacter* strains from Buenos Aires. En: Program and Abstracts of the 36th Interscience Congress of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Nueva Orleans 1996; resumen: C122.
- 35- BSAC Working Party. A guide to sensitivity testing. *J Antimicrob Chemother* 1991; 27 (Suppl D): 137-191.
- 36- Bush K, Jacoby G A, Medeiros A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- 37- Bush K, Tanaka SK, Bonner DP, Sykes RB. Resistance caused by decreased penetration of betalactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1985; 27: 555-560.
- 38- Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989-a; 33: 259-263.

- 39- Bush K. Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989-b; 33:264-270.
- 40- Bush K. Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 1989-c; 33:271-276.
- 41- Cahmberland S. Betalactamases: genetic control. En: Bryan LE. *Microbial resistance to drugs*. Springer Verlag, Berlin 1989; 151-167.
- 42- Carlquist JF, Conti M, Burke JP. Progressive resistance in a single strain of *Acinetobacter calcoaceticus* recovered during a nosocomial outbreak. *Am J Infect Control* 1982; 10: 43-48.
- 43- Castle M, Tenney JH, Weinstein MP, Eickhoff TC. Outbreak of a multiply resistant *Acinetobacter* in a surgical intensive care unit: epidemiology and control. *Heart Lung* 1978; 7: 641-644.
- 44- Citron DM, Kwok YY, Fiorentino N, Appleman MD. *In vitro* activity of azithromycin against *Acinetobacter* strains resistant to routinely tested betalactams, aminoglycosides, quinolones, and imipenem. En: Program and Abstracts of the 4th International Conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides. Barcelona, 1998; resumen: 4.48.

-
- 45- Clark RB. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane proteins. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 245-251.
- 46- Cohen SP, McMurry M, Levy SB. marA locus caused decreased expression of OmpF porin in multiply-antibiotic-resistance (Mar) mutants of *E. coli*. J Bacteriol 1988; 170: 5416-5422.
- 47- Corbella X, Montero A, Pujol M, Dominguez MA, Ayats J, Garrigosa F, Ariza J, Gudiol F. Epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: impact of carbapenem restriction program. En: Program and Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego 1998. resumen: K19.
- 48- Costa SF, Wodcock J, Child J, Caiaffa HH, Gill M, Wise R. Characterization of the betalactamases and outer-membrane proteins of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil. En: Program and Abstracts of the 36th Interscience Congress of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nueva Orleans, 1996. resumen: C.123.
- 49- Craven DE, Barber TW, Steger KA, and Montecalvo MA. Nosocomial pneumonia in the 1990s: update of epidemiology and risk factors. Semin. Respir. Infect. 1990; 5: 157-172.

- 50- Chan MK, Chau PY, Chan WWN, Cheng IKP. Randomized controlled trial of oral ofloxacin vs. intraperitoneal tobramycin for the treatment of paritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (Suppl 5): S1292.
- 51- Chen YC, Chang SC, Hsieh WC, Luh KT. *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Analysis of 48 cases. *J Formos Med Assoc* 1991; 90: 958-963.
- 52- Chirnside ED, Emmerson AM, Smith JT. A follow-up survey of transferable plasmid-encoded trimetropim resistance in a general hospital (1975-1983). *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 419-434.
- 53- Chow AW, Wong J, Bartlett KH. Synergistic interactions of ciprofloxacin and extended spectrum β -lactams or aminoglycosides against *Acinetobacter calcoaceticus* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 9: 213-217.
- 54- Danel F, Hall LM, Gür D, Livermore DM. OXA-15, an extended spectrum variant of OXA-2 betalactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785-790.
- 55- Danel F, Hall LM, Gür D, Livermore DM. OXA-16, a new OXA-10-related betalactamase giving ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. En: Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Nueva Orleans 1996; resumen: C27.

- 56- Danés C, Ruiz J, Jiménez de Anta MT, Vila J. Caracterización de betalactamasas en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. En: VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Palma de Mallorca 1998; resumen: 17.13.
- 57- Dealler S. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter* sp. on an intensive care unit: possible association with ventilation equipment. J Hosp Infect 1998; 38: 147-155.
- 58- Devaud M, Kayser FH, Bächli B. Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in *Acinetobacter* strains. Antimicrob Agents Chemother 1982; 22: 323-329.
- 59- Dhakephalkar PK, Chopade BA. High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. Biometals 1994; 7: 67-74.
- 60- Dib C, Zhou XY, Trias J, Gutmann L, Jarlier V. Combined mechanisms of resistance to Carbapenems in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. En: Program and Abstracts of the 34th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994; resumen: C66.
- 61- Dijkshoorn L, Michel MF, Degener JE. Cell envelope protein profiles of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated in hospitals. J Med Microbiol 1987; a; 23: 313-319.

- 62- Dijkshoorn L, van Vianen W, Degener JE, Michel MF. Typing of *Acinetobacter calcoaceticus* strains isolated from hospital patients by cell envelope protein profiles. *Epidem Infect* 1987-b; 99: 659-667.
- 63- Dijkshoorn L, Wubbels JI, Beunders AJ, Degener JE, Boks AL, Michel MF. Use of protein profile to identify *Acinetobacter calcoaceticus* in a respiratory care unit. *J Clin Pathol* 1989; 42: 853-857.
- 64- Dijkshoorn L, Van Ooyen A, Hop WCJ, Thruns M, Michel MF. Comparison of clinical *Acinetobacter* strains using a carbon source growth assay. *Epidemiol Infect* 1990; 104: 443-453.
- 65- Dijkshoorn L, Aucken AM, Gerner-Smidt P, Kaufmann ME, Ursing J, Pitt TL. Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 702-705.
- 66- Dijkshoorn L, van Dalen R, van Ooyen A, Bijl D, Tjernberg I, Michel MF, Horrevorts AM. Endemic *Acinetobacter* in intensive care units: epidemiology and clinical impact. *J Clin Pathol* 1993; 46: 533-536.
- 67- Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1519-1525.

- 68- Dolzani L, Tonin G, Lagatolla C, Prandin L, Mouti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*- *A. baumannii* complex by restriction analysis of the *16S*-*23S* *rRNA* intergenic spacer sequences. J Clin Microbiol 1995; 33: 1108-1113.
- 69- Douboyas J, Tzouvelekis L S, Tsakris A. *In vitro* activity of ampicillin/sulbactam against multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 1994; 34: 298-300.
- 70- Ehrenstein B, Bernards AT, Dijshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner K, Bouvet PJM, Daschner FD, Grundmann H. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. J.Clin.Microbiol. 1996; 34: 2414-2420.
- 71- Eliopoulos GM, Klimm K, Ferraro MJ, Jacoby GA, Moellering RC. Comparative *in vitro* activity of piperacillin combined with the betalactamase inhibitor tazobactam (YTR 830). Diagn Microbiol Infect Dis 1989; 12: 481-488.
- 72- Fagon JY, Chaster Y, Domart JL, Trouillet J, Pierre J, Darne C, and Gibert C. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Am Rev Respir Dis 1989; 139: 877-884.
- 73- Ferencz A. Azithromycin in the therapy of Ulceroglandular Tularemia. En: Programs and Abstracts of the 4th International Conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides. Barcelona, 1998; resumen: 4.47.

- 74- Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent Sodium-Lauryl Sarcosinate. J Bacteriol 1973; 115: 717-722.
- 75- García Arata I, Gerner-Smidt P, López-Brea M. Epidemiological study of *Acinetobacter* species isolated from an intensive care unit. APMIS 1997; 105: 131-138.
- 76- García I, Fainstein B, Leblanc B, Bodey G.P. *In vitro* activities of new betalactam antibiotics against *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother 1983; 24: 297-299.
- 77- García-Arata M I, Alarcón T, López-Brea M. Emergence of resistant isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*- *A. baumannii* Complex in a Spanish Hospital over a five-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15; 512-515.
- 78- Gerner Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. J Clin Microbiol 1991; 29: 277-282.
- 79- Gerner Smidt P. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. J Clin Microbiol 1992; 30: 2680-2685.

-
- 80- Gerner-Smidt P, Hansen L, Knudsen A, Siboni K, Soegaard Y. Epidemic spread of *Acinetobacter calcoaceticus* in a neurosurgical department analyzed by electronic data processing. J Hosp Infect 1985; 6: 166-174.
- 81- Gerner-Smidt P. Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* in an intensive care unit. J Hosp Infect 1987; 10: 262-272.
- 82- Gerner-Smidt P. Frequency of plasmids in strains of *Acinetobacter calcoaceticus*. J Hosp Infect 1989; 14: 23-28.
- 83- Giammanco A, Vieu JF, Bouvet PJM, Sarzana A, Sinatra A. A comparative assay of epidemiological markers for *Acinetobacter* strains isolated in a hospital. Zbl Bakt 1989; 272: 231-241.
- 84- Go E, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal J. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymixin B and sulbactam. The Lancet 1994; 344: 1329-1332.
- 85- Goldstein EJC, Citron DM. Azithromycin compared to clarithromycin, roxithromycin and erythromycin against *Pasteurella multocida* and other *Pasteurella* species. En: Program and Abstracts of the 4th International Conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides. Barcelona, 1998; resumen: 4.46.

-
- 86- Goldstein FW, Labigne-Roussel A, Gerbaud G, Carlier C, Collatz E, Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. Plasmid 10, 1983. 138-147.
- 87- Gómez-Garcés JL, Alós JL, Pérez-Rivilla A, Cogollos R, Amor E. Actividad *in vitro* de 11 antimicrobianos frente a aislamientos clínicos de *Acinetobacter* spp. Rev Enf Infec Micr Clin 1992; 10: 313-314.
- 88- Gootz TD, Sanders CC, Goering RV. Resistance to cefamandole: derepression of betalactamase by cefoxitin and mutation in *Enterobacter cloacae*. J Infect Dis 1982; 146: 34-42.
- 89- Gradon DJ, Chapnic EK, and Lutwick LI. Infective endocarditis due to *Acinetobacter*: case report and review. Clin. Infect Dis. 1992; 14: 1145-1148.
- 90- Green AR, and Milling MAP. Infection with *Acinetobacter* in a burns unit. Burns 1983; 9: 292-294.
- 91- Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. Multicenter study using standardised protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 1997; 35: 3071-3077.

- 92- Hall LM, Livermore DM, Gür D, Akova, M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) betalactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1637-1644.
- 93- Hancock REW. Role of porins in outer membrane permeability. J Bacteriol 1987; 169: 929-933.
- 94- Hikida M, Yoshida M, Mitsuhashi S, Inoue M. Purification and properties of a cephalosporinase from *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antibiot 1989; 42: 123-126.
- 95- Hogg GM, Barr JG, Webb CH. In-vitro activity of the combination of colistin and rifampin against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 494-495.
- 96- Holton J. A note on the preparation and use of a selective differential medium for the isolation of *Acinetobacter* spp from clinical sources. J Appl Bacteriol 1983; 54: 141-142.
- 97- Hood, J., Amyes, SGB. A novel method for the identification and distinction of the betalactamases of the genus *Acinetobacter*. J applied Bacteriology 1989; 67: 157-163.

-
- 98- Horrevorts A, Bergman K, Kollee L, Breuker I, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Clinical and epidemiological investigation of *Acinetobacter* genospecies 3 in a neonatal intensive care unit. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 1567-1572.
- 99- Horstein M, Sautjeau-Rostoker C, Peduzzi J, Vessieres A, Le Thi Han Hong, Barthelemy M, Scavizzi M, Labia R. Oxacillin-hydrolyzing betalactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microb Letters 1997; 153: 333-339.
- 100- Huber TW, Thomas JS. Detection of resistance due to inducible betalactamase in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. J Clin Microbiol 1994; 32: 2481-2486.
- 101- Ibrahim A, Gerner-Smidt P, Liesack W. Phylogenetic relationship of twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 837-841.
- 102- Isenberg HD. Clin Microbiol Proced. Section 1. American Society for Microbiology; Washington, EEUU 1992.
- 103- Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 1179-1187.

- 104- Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinical important *Acinetobacter* spp and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J Clin Microbiol 1994; 32: 2353-2358.
- 105- Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. J Clin Microb 1996; 34: 2881-2887.
- 106- Joly-Guillou, M.L., Bergogne-Bérézin, E.. Enzymatic resistance to betalactams and aminoglycosides in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1987; 773-776.
- 107- Joly-Guillou M.L, Bergoggne-Bérézin E. Presence d'une betalactamase à spectre élargi chez *Acinetobacter baumannii*. Le Presse Medicale 1990; 19: 672-673.
- 108- Joly-Guillou ML, Bergogne-Bérézin E. *In vitro* activity of sparfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin and temafloxacin against clinical isolates of *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Chemother 1992; 29: 466-468.
- 109- Joly-Guillou ML, Decré D, Bergogne-Bérézin E. Infections nosocomiales à *Acinetobacter*: surveillance épidémiologique hospitalière. Bull Epidemiol Hebd 1992; 6: 211-212.

- 110- Joly-Guillou ML, Decré D, Wolff M, Bergogne-Bérézin E. *Acinetobacter* spp: clinical epidemiology in 89 intensive care units. A retrospective study in France during 1991. En: Abstracts of the 3rd International Conference on the Prevention of Infection 1992; resumen: CJ1.
- 111- Joly-Guillou, ML, Wolff M, Walker F, and Vallée E. A mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia. En: Program and Abstracts of the 3rd International Symposium on the Biology of *Acinetobacter* 1994; resumen: 19.4.
- 112- Joly-Guillou ML, Decree D, Herrman JL, Bourdelier E, Bergogne-Bérézin. Bactericidal *in vitro* activity and betalactamase inhibitors, alone or associated against clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: effect of combinations with aminoglycosides. J Antimicrob Chemother 1995; 36: 619-629.
- 113- Juni E. Genus III. *Acinetobacter*. Brisou et Prévot 1984. En: Krieg NR, Holt JG. Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol 1: 303-307. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- 114- Kazmierczak A, Pechinot A, Sieror E, Cordin X, Labia R. Sulbactam secondary mechanisms of action. Diagn Microbiol Infect Dis 1989; 12: 139-146.
- 115- Kenneth V., Rolston I., Gerald P. Bodey. *In vitro* susceptibility of *Acinetobacter* species to various antimicrobial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1986; 30: 769-70.

- 116- Kosmidis J, Koratzania G. Emergence of resistant bacterial strains during treatment of infections in the respiratory tract. *Scand J Infect Dis* 1986; 49: 135-139.
- 117- Kropec A, Hubner J, Daschner FD. Comparison of three typing methods in hospital outbreaks of *Acinetobacte calcoaceticus* infection. *J Hosp Infect* 1993; 23: 133-141.
- 118- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 119- Lambert T, Gerbaud G, Galimand M, Courvalin P. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus* *aac(6')-I_g* gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies amikacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2093-2100.
- 120- Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P. Characterization of the chromosomal *aac(6')-I_g* gene of *Acinetobacter* sp. 13 and the *aac(6')-I_h* plasmid gene of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1883-1889.
- 121- Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux GE, Collak E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1093-1098.
- 122- Levy SB. Active efflux mechanisms of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 695-703.

- 123- Lin Y, Huang W, Chang D. Antibacterial activity of cefepime *in vitro*. *Chemother* 1994; 40: 384-390.
- 124- Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal betalactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 2046-2048.
- 125- Livermore DM. Carbapenemases: the next generation of betalactamases?. *ASM News* 1993; 59: 129-135.
- 126- Livermore DM. Betalactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-584.
- 127- Livermore DM, Williams JD. β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. En: Lorian VMD, Williams and Wilkins. *Antibiotics in Laboratory Medicine* 1996; 502-578.
- 128- Livermore DM. Acquired Carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 673-676.
- 129- López Hernández S, Alarcón T, López-Brea M. Carbapenem resistance mediated by betalactamases in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 282-285.

-
- 130- López-Brea M, Alarcón T, López S. Consideraciones microbiológicas y terapéuticas de la infección por *Acinetobacter* spp. Rev Esp Quimioterapia 1998; 11: 110-117.
- 131- Lortholary O, Fagon JY, Buu Hoy A, Slama MA, Pierre J, Giral P, Rosenzweig R, Gutmann L, Safar M, Acar J. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis 1995; 20: 790-796.
- 132- Lye WC, Lee EJ, and Ang KK. *Acinetobacter* peritonitis in patients on CAPD: characteristics and outcome. Adv Peritoneal Dialysis 1991; 7: 176-179.
- 133- Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induce efflux system of *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1995; 16: 45-55.
- 134- MacGowan AP, Bowker KE, Bedford KE, Holt HA, Reeves DS, Hedges A. The comparative and inhibitory and bactericidal activities of meropenem and imipenem against *Acinetobacter* spp. and Enterobacteriaceae resistant to second generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 333-337.
- 135- Marcos MA, Abdalla S, Pedraza F, Andreu A, Fernández F, Gómez-Lus R, Jiménez de Anta MT, Vila J. Epidemiological markers of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a spinal cord injury unit. J Hosp Infect 1994; 28: 39-48.

- 136- Marques MB, Brookings ES, Moser SA, Sonke PB, Waites KB. Comparative *in vitro* antimicrobial susceptibilities of nosocomial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 881-885.
- 137- Marques MB, Waites KB, Mangino JE, Hines BB, Moser SA. Genotypic investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a medical intensive care unit. *J Hospital Infection* 1997; 37: 125-135.
- 138- Martin RW, Martin DL, and Levy CS. *Acinetobacter* osteomyelitis from a hamster bite. *Pediatr. Infect. Dis.* 1988; 7: 364-365.
- 139- Martínez-Martínez L, Rodríguez G, Pascual A, Suarez AI, Perea, E. *In vitro* activity of antimicrobial agent combinations against multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob Chemother.* 1996; 38: 1107-1115.
- 140- Matthew M, Harris AM, Marshall MJ, Ross GW. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of betalactamases. *J Gen Microbiol* 1975; 88: 169-178.
- 141- Matthew M. Plasmid-mediated betalactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 349-358.

-
- 142- Medeiros AA, Papa E, Adam C, Miller GH. Gram-negative bacilli to third generation cephalosporins: β -lactamase characterization and susceptibility to Sch 34343. J Antimicrob Chemother 1985; 15: 119-132.
- 143- Melki TS, and Sramek SJ. Trauma induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis. Ann. J. Ophthalmol. 1992; 113: 598-599.
- 144- MENSURA-II. Reunión de la Mesa Española de Normalización de Susceptibilidad y Resistencia a los Antibióticos 1992; 5: 155-158.
- 145- Minami S, Yotsuji A, Inoue M, Mitsuhashi S. Induction of betalactamase by various betalactam antibiotics in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18: 382-385.
- 146- Mizumo T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary rna transcript (micRNA). Proc Nat Acad Sci USA 1984; 81: 1966-1970.
- 147- Moreau NJ, Huot S, Joy-Guillou ML, Bergogne-Bérézin E. Characterisation of DNA gyrase and measurement of drug accumulation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* resistant to fluorquinolones. J Antimicrob Chemother 1996; 38: 1079-1083.

-
- 148- Morohoshi, T., Saito, T. Betalactamase and betalactam antibiotics resistance in *Acinetobacter anitratum* (syn.: *A. calcoaceticus*). J antibiot 1977; 30: 969-973.
- 149- Muller-Serieys C, Lesquoy JB, Perez E, Fichelle B, Boueois B, Joly-Guillou ML, Bergogne-Bérézin. Infections nosocomiales a *Acinetobacter*. Epidemiologie et difficulties therapeutiques. Presse Med 1989; 18: 107-110.
- 150- Musa EK, Desai N, Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. J Hosp Infect 1990; 15: 219-227.
- 151- Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordmann P. Molecular characterization of OXA-20, a peculiar class D betalactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. En: Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto 1997; resumen: C193.
- 152- Nadal D, von Graevenitz. Routine detection of inducible betalactamase in gram-negative bacilli by mean of susceptibility testing. J Microbiol Methods 1993; 17: 283-291.
- 153- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. Villanova, NCCLS, PA: 1997.
- 154- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. NCCLS, 1998.

-
- 155- Ng PC, Herrington RA, Beane CA, Ghoneim AT, Dear PR. An outbreak of *Acinetobacter* septicaemia in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 1989; 14: 363-368.
- 156- Nicas T, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant. J of Bacteriol 1983; 153: 281-285.
- 157- Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1831-1836.
- 158- Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 1994; 264: 382-388.
- 159- Nikaido, H. Role of permeability barriers in resistance to betalactam antibiotics. Pharmacol Ther 1985; 27: 197-231.
- 160- Noble WC, Pitcher DG. Microbial ecology of the human skin . Adv. Microb. Ecol. 1978; 2: 245-289.
- 161- Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum betalactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 128-131.

- 162- Novelli A., Mazzei T., Cassetta M.I., Fallani S., Conti S., Periti P. Outer membrane permeability of Gram-negative rods to cephalosporins. Program and Abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco 1995; resumen: C106.
- 163- Nowak A, Burkiewicz A, Kur J. PCR differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter*. FEMS Microbiol Lett 1995; 126: 181-188.
- 164- O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel method for detection of betalactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob Agents Chemother 1972; 1: 283-288.
- 165- Obana Y, Nishino T, Tanino T. *In-vitro* and *in-vivo* activities of antimicrobial agents against *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1985; 15: 441-448.
- 166- Obana Y. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. Microbiol Immunol 1986; 30: 645-657.
- 167- Obara M. and Nakae T. Mechanisms of resistance to betalactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 791-800.
- 168- Okusu H, Ma D, Nikaujido H. AcrAB efflux pump plays a mJOR role in the antibiotic resistance phenotype of *E. coli* Multiple-Antibiotic-Resistance (Mar) mutants. J Bacteriol 1996; 178: 306-308.

- 169- Olsson Y, Laas T. Isoelectric focusing in agarose under denaturing conditions. *J of Chromatography* 1981; 215: 373-378.
- 170- Papanicolaou G., Medeiros A. Discrimination of extended-spectrum betalactamases by a novel nitrocefin competition assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990, 34: 2184-2192.
- 171- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SGB. ARI-1: B-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 1993; 2: 81-82
- 172- Patterson JE, Vecchio J, Pantelick EL, Farrel P, Mazon D, Zervos M, Hierholzer WJ. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. *Am J Med* 1991; 91: 479-482.
- 173- Paul G, Joly-Guillou M.L., Bergogne-Berézin E, Nevot P, Philippon A. Novel carbenicilin-hidrolyzing betalactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microb Letter* 1989; 59: 45-50.
- 174- Peacock JE, Sorrell L, Sottile FD. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988; 9: 302-308.

- 175- Pedraza F, Andreu A, Saune M, Moreno L, Ramirez L, and García L. A urinary outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a spinal cord injury unit. *Ann Med Int* 1993; 10: 55-58.
- 176- Pérez A.N, Bonet IG, Robledo EH, Abascal RD, Plous CV. Metallobetalactamases in *Acinetobacter calcoaceticus*?. *Medical Science Research* 1996; 24: 315-317.
- 177- Perilli M., Felici A., Oratore A., Cornaglia G., Bonfligio G., Rossolini G. M., Amicosante G. Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* Clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 715-719.
- 178- Phillips I, Warren C, Shannon K, King A, Hanslo D. Ceftazidime: *in vitro* antibacterial activity and susceptibility to β -lactamases compared with that of cefotaxime, moxalactam and other betalactam agents. *J Antimicrob Chemother* 1981; 8 (Suppl B): 23-31.
- 179- Poh CL, Loh GK. Enzymatic profile of clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Med Microbiol Immunol* 1985; 174: 28-33.
- 180- Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 1993; 175: 7363-7372.

- 181- Presterl E, Nadrchal R, Winkler S, Makristathis A, Koller W, Rotter ML, Hirsch AM. Molecular typing of *Acinetobacter baumannii* from ten different Intensive Care Units of a University Hospital. Eur J Clin Microbial Infect Dis 1997; 16: 740-742.
- 182- Rahal JJ, Simberkoff MS. Host defense and antimicrobial therapy in adult gramnegative bacillary meningitis. Ann Intern Med 1982; 96: 468-474.
- 183- Raimondi A, Traverso A, Nikaido H. Imipenem and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1174-1180.
- 184- Ramphal R, Kluge RM. *Acinetobacter calcoaceticus* variety anitratus: an increasing nosocomial problem. Am J Med Sci 1979; 277:57-65.
- 185- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing betalactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 223-232.
- 186- Raz R, Alroy G, Solbel JD. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter calcoaceticus*. Infection 1982; 10: 168-171.
- 187- Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood CA, Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2635-2649.

- 188- Regev R, Dolfin T, Zelig S, Givoni S, and Wolach B. *Acinetobacter* septicemia: a threat to neonates? Special aspects in a neonatal intensive care unit. *Infection* 1993; 21: 394-396.
- 189- Reina, J. Sensibilidad de *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex y *Acinetobacter lwoffii* a los antibióticos de uso cotidiano. *Rev Enf Infec Micr Clin* 1991; 9: 438-439.
- 190- Reinert P. *Pathol Biol* 1995; 43: 551-553.
- 191- Retsema RP, English AR, Girard A. Sulbactam/ampicillin: *in vivo* spectrum, potency, and activity in models of acute infection. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 528-534.
- 192- Rodriguez K, Dickison GM, Greenman RL. Succesful treatment of gram-negative bacillary meniigitis with imipenem/cilastatin. *South Med J* 1985; 78: 731-732.
- 193- Rodriguez MJ, Pachón J, Pichardo C, Cuberos L, Caballero F.J, Moreno I, Jimenez-Mejías ME, García-Curiel A. Eficacia de imipenem, doxiciclina y amikacina en un modelo de neumonía experimental por *Acinetobacter baumannii*. En: VII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 1997; resumen: 93.
- 194- Rosenthal S, Tager LB. Prevalence of Gram negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann. Intern. Med.* 1975; 83: 355-357.

- 195- Rosenthal SL. Sources of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species found in human culture materials. Am J Clin Pathol 1974; 62: 808-811.
- 196- Rossau R, van Landschoot A, Gillis M, De Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov. a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms. Int J Syst Bacteriol 1991; 41: 310-319.
- 197- Roy C, Tirado M, Segura C, Esteva C, Teruel D. Detección de la hiperproducción de betalactamasa cormosómica en cepas de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Enf Infec Microbiol Clín 1989; 7: 301-306.
- 198- Roy C, Tirado M, Morilla A, Esteva C. Detección de la hiperproducción de betalactamasa cormosómica. Enf Infec Microbiol Clin 1990; 8: 123-124.
- 199- Rudant E, Courvalin P, Lambert T. Characterization of IS18, an element capable of activating the silent *aac(6)-Ij* gene of *Acinetobacter* sp. 13 strain BM2716 by transposition. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2759-2761.
- 200- Said R, Krumlovsky FA, del Greco F. Symptomatic *Acinetobacter calcoaceticus* peritonitis. A complication of peritoneal dialysis. J Dial 1980; 4: 101-107.

- 201- Sakata H, Fujita K, Maruyama S, Kakehashi H, Mori Y, Yoshioka H. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. J Hosp Infect 1989; 14: 15-22.
- 202- Samuni A. A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the betalactamase reaction. An Biochem 1975; 63: 17-26.
- 203- Sanders CC, Sanders WE. Emergence of resistance during therapy with the newer beta-lactam antibiotics: role of inducible betalactamases and implications for the future. Rev Infect Dis 1983; 5: 639-648.
- 204- Sanders CC, Sanders WE. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible betalactamases. Antimicrob Agents Chemother 1979; 15: 792-797.
- 205- Saravis Ca, Zamcheck N. Isoelectric focusing in agarose. J Immun Methods 1979; 29: 91-96.
- 206- Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 1991; 28: 35-45.
- 207- Sawai T, Kanno M, Tsukamoto K. Characterization of eight betalactamases of gram negative bacteria. J of Bacteriology 1987; 152: 567-571.

-
- 208- Scaife W, Young H, Paton R, Amyes S. Transferible imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. J Antimicrob Chemother 1995; 36: 585-586.
- 209- Schonwald S, Beus Y, Lisic M. Brief report: ciprofloxacin in the treatment of gram-negative bacillary meningitis. Am J Med 1989; 87 (Suppl 5A): 248S.
- 210- Schubert S, Ullmann U. Activity of gatifloxacin, trovafloxacin, ciprofloxacin, imipenem, meropenem and gentamicin against *Salmonella* spp. and *Acinetobacter* spp. En: Program and Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego 1998; resumen: E-189.
- 211- Schulz G. Bacterial porins: structure and function. Current Opinion in Cell Biology 1993, 5: 701-707.
- 212- Seeberg AH, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Chromosomal betalactamases of *Enterobacter cloacae* are responsible for resistance to third-generation cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 918-925.
- 213- Segev S, Rosen N, Joseph G. Pefloxacin efficacy in gram-negative bacillary meningitis. J Antimicrob Chemother 1990; 26: 187-192.

- 214- Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 279: 544-552.
- 215- Seifert H, Baginski R. The clinical significance of *Acinetobacter baumannii* in blood cultures. *Int J Med Microbiol Virol Parsitol Infect Dis* 1992; 277: 210-218.
- 216- Seifert H, Richter W, Pulverer G. Clinical and bacteriological features of relapsing shunt-associated meningitis due to *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 130-134.
- 217- Seifert H, Strate A, Schulze A, Pulverer G. Vascular catheter related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffi*): report of 13 cases. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 632-636.
- 218- Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., Pulverer, G. Antimicrobial susceptibility to *Acinetobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 750-753.
- 219- Shaw KJ, Hare RS, Sabatelli M, Rizzo M, Cramer CA, Naples L, Kocal S, Munayyer H, Mann P, Miller GH, Verbist L, Landuyt HV, Glupcynsky Y, Catalano M, Woloj M. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2253-2261.

-
- 220- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57: 138-163.
- 221- Sheehan C, Lynch M, Cullen C, Cryan B, Greer P, Fanning S. Genomic fingerprinting *Acinetobacter baumannii*: amplification of multiple inter-repetitive extragenic palindromic sequences. *J Hosp Infect* 1995; 31: 33-40.
- 222- Sherertz R, Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients mattresses. *J Infect Dis* 1985; 151: 252-258.
- 223- Siegman-Igra Y, Bar Yosef S, Gorrea A, Avram J. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 843-849.
- 224- Simon C, Lang F, Holzman RS. Successful treatment of *Acinetobacter calcoaceticus* ventriculitis and development of subsequent chemical meningitis following intraventricular polymyxin B. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 598.
- 225- Smith AW, Freeman S, Minnet WG, Lambert PA. Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 70: 29-32.

- 226- Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, Heritage J, Parnell P, Porter C, Bodenham AR, Inglis T. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. J Clin Microbiol 1996; 34: 1193-1202.
- 227- Struelens MJ, Carlier E, Maes N, Serruys E, Quint WGV, and van Belkum A. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. J Hosp Infect 1993; 25: 15-32.
- 228- Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau V., Bruin-Buisson, C., Duval, J. Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic methods. J Clin Microbiol 1994; 32: 2677-2681.
- 229- Tascini C, Menichetti F, Bozza S, Del Favero A, Bistoni F. Evaluation of the activities of two-drug combinations of rifampicin, polymyxin B and ampicillin/sulbactam against *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 270-271.

- 230- Then RL, Charnas RL, Kocher HP, Mannerberg M, Rothlisberger U, Stocker J. Biochemical characterization of type A and type B betalactamase from *Enterobacter cloacae*. Reviews of Infectious Diseases 1988; 10: 714-720.
- 231- Thornsberry C, Hill BC, Swenson JM, McDougal LK. Rifampin: spectrum of antibacterial activity. Rev Infect Dis 1983; 5 (Supl. 3): 412-417.
- 232- Tilley PAG, Roberts FJ. Bacteremia with *Acinetobacter* species: risk factors and prognosis in different clinical settings. Clin Infect Dis 1994; 18: 896-900.
- 233- Timsit JF, Garrait V, Misset B, The digestive tract is a major site for *Acinetobacter baumannii* colonization in intensive care unit patients. J Infect Dis 1993; 168: 1336-1337.
- 234- Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. Acta Pathol Microbiol Immun Scand 1989; 97: 596-605.
- 235- Torres, A, Aznar R, Gatell JM, Jimenez P, González J, Ferrer A, Celis R, Rodriguez-Roisin. Incidence risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 522-528.
- 236- Towner KJ, Chopade BA. Biotyping of *Acinetobacter calcoaceticus* using the API 20 NE system. J Hosp Infect 1987; 10: 145-151.

- 237- Traub WH, Spohr M, Bauer D. Susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus* to antimicrobial drugs, alone and combined, with and without defibrinated human blood. *Chemother* 1989; 35: 95-104.
- 238- Traub WM, Spohr M. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter* species (*A. baumannii*, *A. haemolyticus*, Genospecies 3, and Genospecies 6). *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1617-1619.
- 239- Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 52-57.
- 240- Tunkel AR. Topical antibacterials. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practises of infectious diseases. Churchill Livingstone, Nueva York, 1995: 381-389.
- 241- Urban C, Go E, Mariano N, Berger BJ, Avraham Y, Rubin D, Rahal JJ. Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter clacoaceticus* biotype anitratus. *J Infect Dis* 1992; 167: 448-451.
- 242- Urban C, Rahal JJ, Luft B. Effect of a beta-lactamase inhibitor, tazobactam, on growth and penicillin-binding proteins of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 82: 113-116.

- 243- Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A. Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum betalactamase among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nation-wide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2265-2269.
- 244- Valdez JM, Asperilla MO, Smego RA. *Acinetobacter* peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *South Med J* 1991; 84: 607-610.
- 245- Vanderbroucke-Grauls C., Kerver A., Rommes J.H., Jansen R., den Dekker C., Verhoef J. Endemic *Acinetobacter anitratus* in a Surgical Intensive Care Unit: Mechanical Ventilators as Reservoir. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 4: 485-489.
- 246- Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouri A, de Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 11-15.
- 247- Vecoli C, Prevost FE, Ververis JJ, Medeiros AA, O'learly GP. Comparison of polyacrilamide and agarose gel thin layer isoelectric focusing for the characterization of betalactamases. *Antimicrob Agents Microbiol* 1983; 24: 186-189.
- 248- Vila J, Almela M, Jimenez de Anta MT. Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1086-1089.

- 249- Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of *the Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. J Med Microbiol 1996; 44: 482-489.
- 250- Vila J, Marcos A, Marco F, Abdalla S, Vergara Y, Reig R, Gomez-Lus R, Jimenez de Anta T. *In vitro* antimicrobial production of betalactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and cloramfenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 138-141.
- 251- Vila J, Ruiz J, Goñi P, Marcos A, Jimenez de Anta T. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1201-1203.
- 252- Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived betalactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents and Chemother 1997; 41: 2757-2759.
- 253- Vila J, Ruiz J, Goñi P, Jimenez de Anta T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 1997; 39: 757-762.

- 254- Villar, H., Laurino, G., Hoffman, M. Actividad bactericida de sulbactam frente a bacterias pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*. Rev Enf Infec Micr Clin 1996; 9: 524-527.
- 255- Visalli MA, Appelbaum PC, Jacobs MR, Moore T, Renzi F. Susceptibility of 238 *Acinetobacter* strains to 10 β -lactams. En: Program and Abstracts of the Interscience Congress of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nueva Orleans, 1996; resumen: E 103.
- 256- Visalli MA, Jacobs MR, Moore TD, Renzi FA, Appelbaum PC. Activities of β -lactams against *Acinetobacter* Genoespecies as determined by agar dilution and E-test MIC methods. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 767-770.
- 257- Waley SG. A spectrofotometric assay of betalactamase action on penicillins. Biochem J 1974, 139: 789-790.
- 258- Weaver RE, Actis LA. Identification of *Acinetobacter* species. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1833.
- 259- Weernink A, Severin WPJ, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter* . J. Hop. Infect. 1995; 29: 189-199.
- 260- Wiedemann B, Kliebe C, Kresken M. The epidemiology of betalactamases. J Antimicrob Chemother 1989; 24 (Supl B): 1-22.

- 261- Wolff M, Joly-Guillou ML, Farinotti Carbon C. Efficacy of various regimen containing Rifampin against multi-resistant *Acinetobacter baumannii* (MRAb) in a mouse pneumonia model. En: Program and Abstracts of the 37th Interscience Congress of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto 1997; resumen: C122.
- 262- Wood CA, Reboli AC. Infections caused by imipenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* biotype *anitratus*. J Infect Dis 1993; 168: 1602-1603.